



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

«Μελέτη της αποδόμησης των εντομοκτόνων εδάφους ethoprophos και chlorpyrifos σε εδάφη απο περιοχές καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα»

ΦΛΩΡΑ ΣΠΕΝΤΖΑ

Λαρίσα 2014

«Μελέτη της αποδόμησης των εντομοκτόνων εδάφους ethoprophos και chlorpyrifos σε εδάφη απο περιοχές καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα»

«Study of the dissipation of soil insecticides ethoprophos and chlorpyrifos in soils from potato cultivation areas in Greece»

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

- Καρπούζας Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μοσιαλος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη καθοδήγηση και πολύ σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε στην οργάνωση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στη συγγραφή και στη διόρθωση του κειμένου της πτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην μεταδιδάκτορα Δρ Ε. Παπαδοπούλου και στον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Καρά για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή τους σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή υποστήριξη καθ'όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος καθορίζεται από φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες. Η βιολογική αποδόμηση αποτελεί την βασικότερη διεργασία απομάκρυνσης των περισσοτέρων γεωργικών φαρμάκων από το περιβάλλον. Στην ακραία της μορφή η μικροβιακή αποδόμηση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων. Αυτό οφείλεται στη ταχύτατη αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου από τους μικροοργανισμούς του εδάφους που ανέπτυξαν ενζυμικά συστήματα κατάλληλα για την αποδόμηση και την χρήση τους ως πηγές ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και εμφανίζεται σε εδάφη ύστερα από την επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών. Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν μια από τις σημαντικότερες ομάδες εντομοκτόνων/νηματοδοκτόνων εδάφους και εμφανίζουν ευαισθησία στο συγκεκριμένο φαινόμενο. Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η υπολειμματικότητα των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων *ethoprophos* και *chlorpyrifos* σε εδάφη με ιστορικό χρήσης ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι εκτεταμένο ή όχι το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα. Συνολικά 17 δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τις περιοχές της Θήβας, του Νευροκοπίου και του Αρχαγγέλου, με διαφορετικό ιστορικό χρήσης για τα εν λόγω γεωργικά φάρμακα και μελετήθηκε η υπολειμματικότητα τους στο εργαστήριο. Εκτός του ιστορικού χρήσης, μελετήθηκε και η επίδραση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών (pH, οργανική ουσία κτλ) στην υπολειμματικότητα των γεωργικών φαρμάκων. Για την εκτίμηση της υπολειμματικότητας προσδιορίστηκε ο χρόνος ημιζωής για τα δύο γεωργικά φάρμακα στα διάφορα εδάφη με την εφαρμογή κατάλληλων μοντέλων κινητικής. Τα *chlorpyrifos* και *ethoprophos* παρουσίασαν τιμές DT50 που κυμάνθηκαν 2,7-56 και 10.7 - 31 ημέρες, αντίστοιχα. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το pH των εδαφών συσχετίστηκε αρνητικά με την υπολειμματικότητα μόνο του *chlorpyrifos* (ταχύτερη αποδόμηση σε αλκαλικά εδάφη). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των τιμών DT50 για τα δύο εντομοκτόνα και των υπόλοιπων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των δύο εδαφών καθώς και με το ιστορικό χρήσης των δύο εντομοκτόνων στα συγκεκριμένα εδάφη. Το τελευταίο εύρημα, καταδεικνύει ότι τα *ethoprophos* και *chlorpyrifos* δεν εμφανίζουν, τουλάχιστον στα εδάφη που μελετήσαμε, πρόβλημα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης που να επηρεάζει την αποτελεσματικότητά τους.

ABSTRACT

The environmental fate of pesticides in soil is determined by physical, chemical and biological processes. The biological degradation is the most important process for removing the majority of pesticides from the environment. In its extreme form, the microbial degradation can lead to reduced effectiveness of pesticides. This is due to the rapid degradation of the pesticide by soil microorganisms developed enzyme systems suitable for degradation and their usage as sources of energy for their growth and development. This phenomenon is called accelerated microbial degradation and occurs in soils after repeated application of the same pesticide on the same field for many years. The organophosphate pesticides are one of the major groups of soil insecticides / nematicides and develop sensitivity to this phenomenon. So in this study, it was determined the persistence of organophosphorus pesticides, chlorpyrifos and ethoprophos in soils with a history of usage, in order to reveal whether it is extended or not the phenomenon of accelerated microbial degradation of these pesticides. Total of 17 soil samples were collected from areas of Thebes Nevrokopiou and Archangel, with different usage history for these pesticides and their persistence was studied in the laboratory. Besides the usage history, it was studied the influence of the physicochemical characteristics of soils (pH, organic matter, etc.) in the persistence of pesticides. To estimate the persistence it was determined the half-life for both pesticides in various soils by applying appropriate kinetic models. The chlorpyrifos and ethoprophos presented DT50 values ranging from 2.7 - 56 and 10.7 - 31 days, respectively. Statistical analysis of the results showed that the soil pH was negatively correlated with the persistence of chlorpyrifos alone (faster degradation in alkaline soils). In contrast, there was no correlation between the DT50 values for both insecticides and other physicochemical characteristics of both soils and the history usage of the two insecticides in these territories. The last finding, indicates that ethoprophos and chlorpyrifos do not show, at least in the soils studied, a problem of accelerated biodegradation affecting their effectiveness.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γεωργικά φάρμακα-Περιβαλλοντική τύχη και Συμπεριφορά	9
1.2 Μικροβιακή αποδόμηση	15
1.3 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	18
1.3.1 Σταθερότητα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης	21
1.3.2 Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	21
1.4 Οργανοφωσφορικά	22
1.4.1 Χημική δομή των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	22
1.4.2 Τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	23
1.4.3 Μικροβιακή αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	24
1.5 Chlorpyrifos	25
1.5.1 Μικροβιακή αποδόμηση chlorpyrifos	27
1.6 Ethoprophos	29
1.6.1 Μικροβιακή αποδόμηση ethoprophos	30
1.7 Σκοπός πειράματος	31

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδαφών	32
2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών	36
2.2.1 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών	37
2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών	37
2.2.3 Προσδιορισμός pH, περιεκτικότητα σε οργανικό C και μηχανική σύσταση	38
2.2.4 Αποτελεσματικότητα των εδαφολογικών αναλύσεων	38
2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και γεωργικά φάρμακα	40
2.4 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων	40
2.4.1 Εκχύλιση chlorpyrifos από το έδαφος	40
2.4.2 Εκχύλιση ethoprophos από το έδαφος	41
2.5 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	42
2.6 Περιγραφή πειράματος αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων	43
2.7 Υπολογισμός DT50 στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποδόμηση chlorpyrifos	46
3.1.1 Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη που μελετήθηκαν	48
3.1.2 Συσχέτιση DT ₅₀ του chlorpyrifos με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν	50
3.1.3 Ο μεταβολισμός του chlorpyrifos στα εδάφη	51
3.2 Αποδόμηση ethoprophos	54
3.2.1 Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του ethoprophos στα εδάφη που μελετήθηκαν	56
3.2.2 Συσχέτιση DT ₅₀ του ethoprophos με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν	59

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συζήτηση	60
4.1.1 Chlorpyrifos	60
4.1.2 Ethoprophos	61
4.2 Συμπεράσματα- προτάσεις	62

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
---------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γεωργικά φάρμακα – Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά

Η συνεχόμενη αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού που συνεπάγεται την ανάλογη ζήτηση σε τρόφιμα έχει καταστήσει επιτακτική τη χρήση κάθε δυνατού μέσου για την αύξηση παραγωγής των καλλιεργειών γεωργικών προϊόντων. Αυτά τα μέσα συμβάλλουν κυρίως στη βελτίωση μεθόδων καλλιέργειας, στην αύξηση της γονιμότητας των εδαφών, και στην βελτίωση της φυτοπροστασίας.

Η γεωργική παραγωγή υφίσταται σημαντικές απώλειες από ένα πλήθος εχθρών (έντομα, μικροοργανισμοί και ζιζάνια). Για την προστασία της γεωργικής παραγωγής λαμβάνονται μια σειρά μέτρων ελέγχου και καταπολέμησης των εχθρών και ασθενειών τα οποία διακρίνονται σε καλλιεργητικά και χημικά. Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου ή ζιζανίου καλείται γεωργικό φάρμακο ή φυτοφάρμακο ή αλλιώς φυτοπροστατευτικό.

Τα γεωργικά φάρμακα όταν χρησιμοποιούνται σύμφωνα με την ετικέτα, συμβάλλουν στη αύξηση της αγροτικής παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων, αφού καταστέφουν τους βλαβερούς οργανισμούς που εμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών ή τους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα προϊόντα και καταστρέφουν πολλές φορές ολόκληρη την παραγωγή (Μπέλου 2008). Τα πλεονεκτήματα των γεωργικών φαρμάκων έναντι άλλων φυτοπροστατευτικών μεθόδων είναι ότι παρουσιάζουν ευκολία στην εφαρμογή, έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών, σύντομο χρόνο δράσης και σχετικά χαμηλό κόστος. Στόχος της φυτοπροστασίας είναι η χρήση χημικών ενώσεων όσο το δυνατόν πιο φιλικών προς το περιβάλλον σε συνδυασμό με την μέγιστη δυνατή δράση και αποτελεσματικότητα (Λύκας, 2009).

Ο ρόλος των γεωργικών φαρμάκων επιγραμματικά είναι να:

- προστατέψουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδος επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλάβουν τη δράση τους
- διατηρούν τα φυτικά προϊόντα
- καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά
- καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους.

Τα γεωργικά φάρμακα διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος του εχθρού που καταπολεμούν, τον τρόπο δράσης τους, την τοξικότητα τους, τη χημική δομή τους και τον τρόπο παρασκευής-σύνθεσης τους. Ανάλογα με το είδος του εχθρού ταξινομούνται σε ακαρεοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και νηματωδοκτόνα. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους (ικανότητα κίνησης μέσα στα φυτά) διακρίνονται σε επαφής (παραμένουν στην επιφάνεια του φυτού) ή διασυστημικά (εισέρχονται και κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς) (Τσοχατζής 2012). Επίσης τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να είναι συνθετικές χημικές ενώσεις (ανόργανες και οργανικές) δηλαδή προϊόντα χημικής σύνθεσης στο εργαστήριο ή φυσικής προέλευσης (βιολογικά γεωργικά φάρμακα-biopesticides) δηλαδή προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού φυτών, μικροοργανισμών και εντόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007). Με βάση την χημική τους δομή τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω βασικές ομάδες:

1. Οργανοχλωριωμένα
2. Οργανοφωσφορικά
3. Πυρεθρινοειδή
4. Καρβαμικά
5. Νεονικοτινοειδή
6. Διθειοκαρβαμικά

7. Αζόλες
8. Παράγωγα ουρίας
9. Φαινυλαμίδια
10. Τριαζίνες
11. Ανιλινοπυριμιδίνες
12. Ανιλιδοπυριμιδίνες

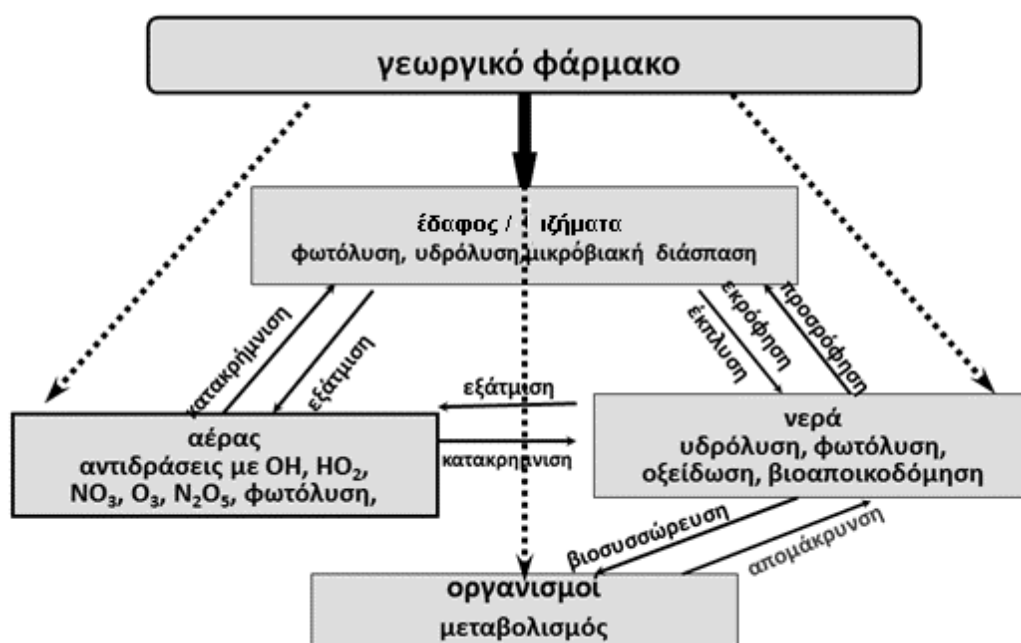
Τα τελευταία χρόνια, η χρήση γεωργικών φαρμάκων έχει αυξήσει σημαντικά την ποσότητα και έχει βελτιώσει την ποιότητα της τροφής για τον αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό, παράλληλα όμως, έχει σημειώσει αύξηση των δυσμενών επιπτώσεων σε οργανισμού μη-στόχους, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Επίσης η εκτεταμένη και μη ορθή χρήση των γεωργικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί κινδύνους ρύπανσης και υποβάθμισης του περιβάλλοντος. Με βάση μελέτη του Ο.Η.Ε., εκτιμάται ότι από τη συνολική ποσότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για αγροτικούς σκοπούς μόνο το 1% φτάνει τελικά, στο καλλιεργούμενο φυτό, ενώ το υπόλοιπο καταλήγει και ρυπαίνει το περιβάλλον, δηλαδή το έδαφος, τον αέρα και κυρίως το νερό (Malato et al., 2001). Στο Σχήμα 1 φαίνονται επιγραμματικά οι διεργασίες αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον.

Υπάρχουν δύο κύριες οδοί μέσω των οποίων τα γεωργικά φάρμακα εισέρχονται στο έδαφος: μετακίνηση του ψεκαστικού νέφους στο έδαφος ύστερα από διαφυλλική εφαρμογή (Rial-Otero et al, 2003) και απευθείας εφαρμογή στο έδαφος για καταπολέμηση οργανισμών φυτικών εχθρών που διαβιούν στο έδαφος (Lo-pezz- Pe-rez et al, 2006).

Μετά την εισροή των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος είναι απαραίτητη η εκτίμηση της υπολειμματικότητας τους (Arias-Este-vez et al, 2005 α, β, Lo-pezz- Blanco et al, 2005) που καθορίζεται από βασικές διεργασίες όπως είναι η προσρόφηση – εκρόφηση στα εδαφικά κολλοειδή και η βιολογική ή αβιοτική αποδόμηση τους. Κατά τη μελέτη των ζητημάτων αυτών, ιδιαίτερα σε πειράματα

στον αγρό, είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών που επιτρέπουν την χωρίς παρεμβολές και ακριβής ποσοτικοποίηση τους (Rial-Otero et al, 2004).

Η περιβαλλοντική τύχη των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος διέπεται από μια ποικιλία πολύπλοκων δυναμικών φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, που ελέγχουν άμεσα τη μεταφορά των γεωργικών φαρμάκων εντός του εδάφους και τη μεταφορά τους από το έδαφος στο νερό ή στο φαγητό. Αυτές είναι η βιολογική και χημική αποδόμηση, η προσρόφηση-εκρόφηση, η επιφανειακή απορροή, η έκπλυση και η πρόσληψη από τα φυτά. Η σχετική σημασία αυτών των διαδικασιών ποικίλλει ανάλογα με τη χημική φύση των γεωργικών φαρμάκων και τις ιδιότητες του εδάφους, αλλά δύο διεργασίες είναι αυτές που έχουν καθοριστικό ρόλο: η αποδόμηση και η προσρόφηση (Linn et al, 1993).



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον

Βιολογική αποδόμηση: Είναι θεμελιώδους σημασίας για την μείωση των επιπέδων των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος (Guo et al, 2000). Κατά τη βιολογική αποδόμηση προκαλείται διάσπαση, αποσύνθεση και αδρανοποίηση του γεωργικού φαρμάκου από μικροοργανισμούς που αποτελούν τους κύριους αποδομητές των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον. Σημαντικές βιοχημικές

διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη βιολογική αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων είναι οι απαλκυλίωση, απαλογόνωση, οξειδωση ή αναγωγή, υδρόλυση και υδροξυλίωση (Λύκας 2009).

Χημική αποδόμηση: Είναι η διάσπαση ενός γεωργικού φαρμάκου αποκλειστικά με χημικές αντιδράσεις παρουσία (αερόβιες συνθήκες) ή απουσία (αναερόβιες συνθήκες) οξυγόνου. Τέτοιες αντιδράσεις είναι υδρόλυση και οξειδοαναγωγή. Καθοριστικός παράγοντας είναι το pH και η διαθεσιμότητα του γεωργικού φαρμάκου στο περιβάλλον (νερό, έδαφος, υπέδαφος) (Δ.Θ. Λύκας, 2009).

Φωτοαποδόμηση – Φωτόλυση: Είναι η έμμεση ή άμεση διάσπαση ενός γεωργικού φαρμάκου στην ατμόσφαιρα (έδαφος, νερό ή στα φυτά) από τη δράση του φωτός, εξαιτίας απορρόφησης ηλιακής ενέργειας, μήκους κύματος (λ) από 290 έως 400 nm (Δ.Θ. Λύκας, 2009).

Προσρόφηση: Είναι η προσέλκυση και η συγκράτηση των μορίων του γεωργικού φαρμάκου από την επιφάνεια των κολλοειδών του εδάφους (ανόργανων ή οργανικών) ή άλλων συστατικών. Παίζει θεμελιώδη ρόλο στη δυναμική μεταφορά, την εμμόνη, τη μετατροπή και τη βιοσυσσώρευση των γεωργικών φαρμάκων (De Jonge και άλλοι, 1996). Η προσρόφηση εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη του εδάφους (Spark and Swift, 2002, Coquet, 2003). Η μοριακή φύση της οργανικής ύλης του εδάφους έχει αποδειχθεί ότι είναι το κλειδί για τον προσδιορισμό προσρόφησης μη ιοντικών γεωργικών φαρμάκων (Ahmad et al, 2006). Άλλοι Παράγοντες που επηρεάζουν την προσρόφηση των γεωργικών φαρμάκων είναι το είδος των ανόργανων κολλοειδών, το pH του εδάφους, η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους (Δ.Θ. Λύκας, 2009). Η πιο σημαντική ιδιότητα ενός γεωργικού φαρμάκου που επηρεάζει τη μετακίνησή του και καθορίζει κατά κάποιον τρόπο την τύχη του στο περιβάλλον είναι η υδατοδιαλυτότητα του. Όταν ένα γεωργικό φάρμακο βρεθεί στο έδαφος ένα μέρος αυτού θα προσροφηθεί στα κολλοειδή σωματίδια του εδάφους μέσω της προσρόφησης (absorption) και ένα μέρος θα διαλυθεί στο εδαφικό διάλυμα του εδάφους. Καθώς όλο και περισσότερο νερό εισέρχεται στο έδαφος μέσω της βροχής ή της άρδευσης, το προσροφημένο στα κολλοειδή του εδάφους γεωργικό φάρμακο ελευθερώνεται από την επιφάνεια των εδαφικών κολλοειδών και επαναδιαλύεται στο εδαφικό διάλυμα με μια διαδικασία που ονομάζεται εκρόφηση (desorption). Η διαλυτότητα ενός γεωργικού

φαρμάκου και η προσρόφηση του στο έδαφος σχετίζονται αντιστρόφως, δηλαδή υψηλή υδατοδιαλυτότητα οδηγεί σε χαμηλότερη προσρόφηση (Rao and Hornsby, 2001).

Έκπλυση (Leaching): Η έκπλυση είναι η διεργασία εκείνη κατά την οποία ένα γεωργικό φάρμακο, το οποίο βρίσκεται διαλυτοποιημένο στο εδαφικό διάλυμα, μπορεί να μετακινηθεί με το νερό προς τα βαθύτερα στρώματα και να καταλήξει στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Παράγοντες που επηρεάζουν την έκπλυση σχετίζονται κυρίως με το έδαφος (π.χ. φυσικοχημική σύσταση εδάφους, φυσικοχημικές ιδιότητες εδάφους) αλλά και μη εδαφικούς παράγοντες (π.χ. κλιματολογικές συνθήκες, τρόπος εφαρμογής, καλλιεργητικές πρακτικές, φυσικοχημικές ιδιότητες γεωργικού φαρμάκου)

Επιφανειακή απορροή (Run-off): Τα γεωργικά φάρμακα, που εφαρμόζονται στα φυτά ή στο έδαφος, μπορούν να μετακινηθούν επιφανειακά με το νερό της άρδευσης ή της βροχής και η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιφανειακή απορροή. Σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την πιθανότητα επιφανειακής απορροής είναι η δυνατότητα προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων στα εδαφικά κολλοειδή. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιφανειακή απορροή είναι: η υδατοδιαλυτότητα του γεωργικού φαρμάκου και η μορφή του σκευάσματος με το οποίο εφαρμόζεται, η υπολειμματικότητα του γεωργικού φάρμακος η προσρόφηση, η πρόσληψη από τα φυτά, η κλίση του εδάφους και οι καιρικές συνθήκες (Δ.Θ. Λύκας, 2009). Για παράδειγμα ισχυρές βροχοπτώσεις με ύψος που ξεπερνά την απορροφητική ικανότητα του εδάφους οδηγούν σε επιφανειακή απορροή του νερού και έτσι ευνοούν και την επιφανειακή απορροή υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που βρίσκονται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους.

1.2. Μικροβιακή αποδόμηση

Μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από μικροοργανισμούς. Στην διάρκεια

της μικροβιακής αποδόμησης σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές, είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Οι πιο πολλοί μικροοργανισμοί, που κατοικούν στο έδαφος, όπου το οξυγόνο είναι άφθονο αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα μέσω του αερόβιου μεταβολισμού τους. Όταν ένα γεωργικό φάρμακο υφίσταται πλήρη αερόβιο μεταβολισμό, ανοργανοποιείται και μετατρέπεται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή άλλων τελικών προϊόντων όπως το μεθάνιο.

Η διάσπαση των οργανικών ουσιών που πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς έχει ως σκοπό την επιβίωση και την αύξηση τους. Σε ένα μικροβιακό κύτταρο λαμβάνουν χώρα δύο βασικές κατηγορίες μεταβολικών αντιδράσεων, ο αναβολισμός και ο καταβολισμός. Οι διεργασίες του αναβολισμού οδηγούν στην παραγωγή βιομάζας, δηλαδή ανάπτυξη του μικροοργανισμού, και απαιτούν την ύπαρξη πηγής άνθρακα. Από την άλλη μεριά οι καταβολικές αντιδράσεις οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση και ανάπτυξη των οργανισμών, απαιτούν δηλαδή μια πηγή ενέργειας.

Τα γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας ταυτόχρονα. Η εξασφάλιση ενέργειας γίνεται μέσω οξείδωσης των γεωργικών φαρμάκων διαμέσου μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, στην οποία ο ρύπος είναι το αναγωγικό σώμα το δε ρόλο του οξειδωτικού έχουν διάφορες ενώσεις, ανάλογα με τον τύπο της διαδικασίας του μεταβολισμού:

Αερόβια αναπνοή είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει το μεταβολισμό ενώσεων όταν δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο (O_2). Πολυάριθμοι μικροοργανισμοί ακολουθούν αυτό το είδος μεταβολισμού και οι περισσότερες μέθοδοι βιοαποκατάστασης αξιοποιούν αυτή τη συγκεκριμένη κατηγορία μεταβολισμού.

Υπάρχει εντούτοις μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που επιβιώνουν και αναπτύσσονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας σαν δέκτη ηλεκτρονίων διάφορες άλλες ανόργανες ή οργανικές ενώσεις διαφορετικές από το οξυγόνο. Αυτός ο τύπος μεταβολισμού χαρακτηρίζεται σαν αναερόβια αναπνοή. Οι

συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι δέκτες ηλεκτρονίων κάτω από αναερόβιες συνθήκες είναι τα νιτρικά και τα θειικά ιόντα, διαλυτά συστατικά στα υπόγεια νερά, καθώς και ο τρισθενής σίδηρος, και το τετρασθενές μαγγάνιο, που αποτελούν συστατικά των στερεών σωματιδίων του εδάφους συνήθως στη μορφή οξειδίων.

Ένας άλλος τύπος μεταβολισμού που μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε ισχυρά αναερόβιες συνθήκες είναι η ζύμωση. Κατά τη ζύμωση δεν απαιτείται εξωτερική προσθήκη ενός δέκτη ηλεκτρονίων, διότι το γεωργικό φάρμακο χρησιμοποιείται ταυτόχρονα σαν δότης και σαν δέκτης ηλεκτρονίων. Η βιοαποδόμηση λαμβάνει χώρα κυρίως με αερόβιους μικροοργανισμούς. Όταν το οξυγόνο εξαντλείται αλλά το οξειδοαναγωγικό δυναμικό παραμένει σχετικά υψηλό, η βιοδιάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας νιτροαναγωγικών βακτηρίων. Τα οξείδια του σιδήρου του εδάφους μπορούν να δράσουν σαν δέκτες ηλεκτρονίων σε μια ευρεία κλίμακα τιμών οξειδοαναγωγικού δυναμικού, αλλά έχουν σχετικά περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα ανάλογα με την κρυσταλλικότητά τους. Τέλος τα θειοαναγωγικά και τα μεθανογόνα βακτήρια είναι δραστικά μόνον κάτω από έντονα αναγωγικές συνθήκες (Kuo, 1999).

Η ύπαρξη και η ένταση του φαινομένου της μικροβιακής αποδόμησης επηρεάζονται τόσο από το μέσο στο οποίο γίνεται η αποδόμηση (έδαφος) όσο και από τους μικροοργανισμούς-αποδομητές και σε πολλές περιπτώσεις οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν (Simon et al., 1992). Στο έδαφος η μικροβιακή διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων γίνεται από διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια, ακτινοβακτήρια και άλγη (Levanon, 1993). Η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την δράση ενός μικροοργανισμού ή συχνότερα ομάδας (consortia) μικροοργανισμών (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους αναπτύσσονται σε λεπτά στρώματα που περιβάλλουν τα κολλοειδή του εδάφους και χαρακτηρίζονται ως βιοστρώματα. Ταχύτερη μικροβιακή αποδόμηση παρατηρείται σε περιοχές στις οποίες επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας (Torr et al., 1995). Υψηλότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί και επομένως υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται στα επιφανειακά εδαφικά στρώματα με αποτέλεσμα ταχύτερη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων να πραγματοποιείται στο

επιφανειακό έδαφος (Accineli et al 2001). Αντίθετα οι ολιγοτροφικές συνθήκες που επικρατούν στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί με χαμηλότερη δραστηριότητα και επομένως να παρατηρούνται βραδύτεροι ρυθμοί αποδόμησής των γεωργικών φαρμάκων. Όπως όλοι οι κανόνες έχουν τις εξαιρέσεις τους, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις όπου ο ρυθμός αποδόμησης συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα είναι ο ίδιος ή και υψηλότερος σε σύγκριση με το αντίστοιχο επιφανειακό έδαφος (Di et al., 1998).

Για να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου, οι μικροοργανισμοί του εδάφους ή τα καταβολικά ένζυμα που παράγουν πρέπει να έρθουν σε επαφή με την ουσία και στη συνέχεια αυτή ή τα προϊόντα του μεταβολισμού της να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου (Aislabie and Lloyd-Jones, 1995). Η πλήρης αποδόμηση ενός οργανικού μορίου είναι συνήθως προϊόν μικροβιακής αποδόμησης. Μέσω της διαδικασίας αυτής οι μικροοργανισμοί αυξάνουν τη βιομάζα τους χρησιμοποιώντας τον άνθρακα των οργανικών ενώσεων ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνουν τους πληθυσμούς τους σε αριθμό και μέγεθος. Η μελέτη και απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούν αυτά ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους έδειξε ότι αυτά συνήθως είναι βακτήρια, μύκητες και ακτινοβακτήρια (Suett et al., 1996). Η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών, όπως ανοργανοποίηση, συµμεταβολισμός, πολυμερισμός, συμπλοκοποίηση και συσώρευση, είτε έμμεσα μέσα από επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες (Bollag & Liu 1990, Kookana et al., 1998).

1.3. Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Πριν από την αποδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων, υπάρχει μια χρονική περίοδος κατά τη διάρκεια της οποίας, παρατηρείται μηδαμινή απομάκρυνση της

χημικής ουσίας. Αυτή η φάση, που αναφέρεται και ως φάση υστέρησης (lag phase) υποδεικνύει μια περίοδο εγκλιματισμού ή προσαρμογής των μικροοργανισμών στην χημική δομή της ουσίας στην οποία εκτέθηκαν.

Η διάρκεια της φάσης υστέρησης ή προσαρμογής ποικίλλει και κυμαίνεται από μια ώρα ως και μήνες και να διαφοροποιείται μεταξύ των χημικών ουσιών και του περιβάλλοντος. Επιπλέον, επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η θερμοκρασία ασκεί σημαντική επίδραση στη διάρκεια της περιόδου προσαρμογής πριν από την ενεργό φάση. Επίσης, το pH και ο αερισμός ενός περιβάλλοντος παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάρκεια της φάσης προσαρμογής. Η συγκέντρωση του N, του P ή και τα δύο μαζί είναι σημαντική καθώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να περιορίσουν τη μικροβιακή αύξηση. Είναι δυνατόν οι μικροοργανισμοί να χρησιμοποιούν το ανόργανο φωσφορικό άλας ή το N, από το περιβάλλον αντί αυτών που προέρχονται από το γεωργικό φάρμακο. (Alexander, 1999).

Με την πάροδο του χρόνου έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα γεωργικά φάρμακα χάνουν την αποτελεσματικότητά τους. Η μείωση αυτή της αποτελεσματικότητας έχει αποδοθεί είτε στην επικράτηση ανθεκτικών στελεχών εντόμων, μυκήτων ή βιοτύπων φυτών ή (ειδικότερα για τα γεωργικά φάρμακα που εφαρμόζονται στο έδαφος) στη ταχύτατη αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου από τους μικροοργανισμούς του εδάφους που ανέπτυξαν κατά την διάρκεια της φάσης προσαρμογής ενζυμικά συστήματα κατάλληλα για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και προκύπτει για ορισμένες ομάδες γεωργικών φαρμάκων ύστερα από την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών (Alexander, 1999).

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί μετά από μια μόνο εφαρμογή ή μετά από πολυετής εφαρμογές και είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ γεωργικών φαρμάκων και μικροοργανισμών (Racke and Coats, 1988). Επίσης μπορεί να συμβεί από την συνεργιστική δράση δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών (Read, 1986a). Η εμφάνιση της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μικροβιακού πληθυσμού ικανού να χρησιμοποιήσει το γεωργικό φάρμακο σαν πηγή

θρεπτικών συστατικών με σκοπό την αύξηση και ανάπτυξή του. (Felsot and Shelton, 1993)

Η μικροβιακή κοινότητα για να αποδομήσει μια συγκεκριμένη χημική ουσία στο έδαφος θα πρέπει να εμφανίσει α) μια αύξηση στη δραστηριότητα αποδόμησης ενός περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών λόγω, της εκλεκτικής έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν καταβολικά ένζυμα, β) μια αύξηση στον αριθμό των βιοαποδομητών λόγω, της μικροβιακής αύξησης γ) τη μετακίνηση άλλων ικανών μικροοργανισμών εξαιτίας της αποδόμησης στην περιοχή της εφαρμογής και δ) τη εξελικτική εμφάνιση νέων καταβολικών ενζύμων για τη χρήση της χημικής ουσίας ως πηγή ενέργειας. Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια είναι οι κυρίαρχοι παράγοντες της επιταχυνόμενης αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων ενώ, οι μύκητες έχουν περιορισμένο ρόλο στο φαινόμενο αυτό.

Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης είναι αποτέλεσμα της σταδιακής μικροβιακής προσαρμογής στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του (Karpouzas & Walker, 2000b). Αποτέλεσμα της επιταχυνόμενης αποδόμησης είναι η αποτυχία του γεωργικού φαρμάκου να περιορίσει αποτελεσματικά τους εχθρούς-στόχους λόγω της μεγάλης μείωσης της παραμονής της στο έδαφος. Η επιταχυνόμενη αποδόμηση είχε αρχικά θεωρηθεί ως ευεργετική διεργασία που οδηγεί στην ταχύτατη μείωση των ανεπιθύμητων υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόζονται στο έδαφος και συνεπώς μείωνε την πιθανότητα μετακίνησής τους στα υπόγεια και επιφανειακά νερά (Felsot, 1989) . Παρόλα αυτά τα φαινόμενο αυτό μπορεί να επιφέρει οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές, αφού μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας ορισμένων γεωργικών φαρμάκων λόγω της ταχύτατης μείωσης της συγκέντρωσής τους σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για τον έλεγχο των οργανισμών- στόχων (Torr et al., 1995).

Το ποσοστό αποδόμησης και η έκταση της μικροβιακής αύξησης κατά τη διάρκεια της αποδόμησης επηρεάζονται από τη δομή του γεωργικού φαρμάκου. Συνήθως, γεργικά φάρμακα με απλές χημικές δομές που χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτότητα και χαμηλή ικανότητα προσρόφησης μπορούν εύκολα να

υποστηρίξουν τη μικροβιακή αύξηση και εμφανίζουν πιο γρήγορα προβλήματα επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Γεωργικά φάρμακα που χαρακτηρίζονται από χημικές δομές που εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με φυσικές ουσίες που απαντούν οι μικροοργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον όπως το έδαφος αποδομούνται ευκολότερα από τις περισσότερες μικροβιακές κοινότητες αμέσως μετά από την εισαγωγή τους στο περιβάλλον. Αντίθετα, τα γεωργικά φάρμακα με δομή διαφορετική από τις περισσότερες φυσικές ουσίες (ξеноβιοτικές ενώσεις) αποδομούνται αργά λόγω του γεγονότος ότι, οι μικροοργανισμοί δεν κατέχουν εξαρχής ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Τέτοια γεωργικά φάρμακα εμφανίζουν γενικότερα ανθεκτικότητα στην μικροβιακή αποδόμηση και συνήθως δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση (Arbeli and Fuentes, 2007).

Τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως δομή, θρεπτική κατάσταση, οργανική ουσία και pH αποτελούν παραμέτρους, με σημαντικές επιδράσεις στον ρυθμό αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Μεταβολή σε ένα από τα χαρακτηριστικά του εδάφους μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη διαθεσιμότητα ή την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων συχνά με εντελώς διαφορετικό τρόπο (Walker and Roberts, 1993). Από τους εδαφικούς παράγοντες το pH και η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία επηρεάζουν κυρίως την εμφάνιση και ανάπτυξη της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Ακόμη και μικρές αλλαγές στο pH επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας. Στα αλκαλικά εδάφη ευνοείται η εμφάνιση του φαινομένου, είτε άμεσα με επίδραση στη χημική σταθερότητα της φυτοπροστατευτικής ουσίας είτε έμμεσα με επίδραση στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας (Suett et al., 1996).

Αύξηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ουσία συνεπάγεται αύξηση της προσρόφησης των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητάς τους για αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς του εδάφους.

1.3.1 Σταθερότητα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης

Η σταθερότητα ή εμμονή του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης από την στιγμή που θα παρατηρηθεί σε ένα έδαφος μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών εδαφών και μεταξύ διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων. Η χρονική στιγμή, στην οποία ένα έδαφος που εμφανίζει πρόβλημα επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης μπορεί ξανά να δεχθεί με ασφάλεια εφαρμογή με το ίδιο γεωργικό φάρμακο εξαρτάται από τη δόση και συχνότητα εφαρμογής, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας και την ικανότητα των μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν την ουσία σαν πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών (Anderson et al., 1998). Σημαντικές διαφορές στην εμμονή του φαινομένου έχουν καταγραφεί μεταξύ οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών νηματωδοκτόνων (Chapman and Harris, 1990)

1.3.2. Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα γεωργικό φάρμακο αποδομείται ταχύτατα σε έδαφος στο οποίο δεν έχει καταγραφεί προηγούμενη χρήση του, αλλά το έδαφος έχει εκτεθεί σε κάποιο άλλο γεωργικό φάρμακο με παρόμοια χημική δομή. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει καταγραφεί ότι η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να γίνεται ευκολότερα μετά από εφαρμογή στο έδαφος διαφορετικού, αλλά της ίδιας χημικής ομάδας, γεωργικού φαρμάκου, παρά ύστερα από εφαρμογή του ίδιου του γεωργικού φαρμάκου που μελετούμε (Arbeli and Fuentes, 2007).

1.4 Οργανοφωσφορικά

Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν σήμερα την πλέον διαδεδομένη κατηγορία εντομοκτόνων. Πρωτοπόρος στην ανακάλυψη τους ήταν ο Γερμανός Schrader στη διάρκεια του Β' Παγκόσμιου Πολέμου (Cupta 2005). Η χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων που χαρακτηρίζονταν από σχετικά μικρή υπολειμματικότητα και υψηλή αποτελεσματικότητα, ήρθε να αντικαταστήσει τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα που παρουσίαζαν υψηλή υπολειμματικότητα στο

περιβάλλον αλλά κυρίως λόγω της λιποφιλικότητας τους παρουσιάζαν τάση βιοσυσσώρευσης σε κλειστές τροφικές αλυσίδες.

Τα οργανοφωσφορικά αποτελούν παράγωγα οργανικών ενώσεων, στα οποία έχει προστεθεί φώσφορος. Κατηγοριοποιούνται σε φωσφονικά, θειοφωσφορικά και διθειοφωσφορικά. Οι πιο γνωστοί εκπρόσωποι των τριών αυτών κατηγοριών είναι ο Dichlorvos, Parathion και το Malathion αντίστοιχα. Συχνώς χρησιμοποιούμενα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι το chlorpyrifos και το ethoprophos.

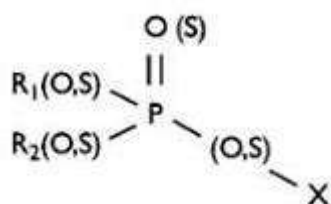
Τα οργανοφωσφορικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά εναντίον των μυζητικών εντόμων, όπως η μελίγκρα και τα ακάρεα, τα οποία τρέφονται απομυζώντας τους χυμούς των φυτών. Εφαρμόζονται είτε διαφυλλικά στο υπέργειο τμήμα του φυτού είτε με ριζοπότισμα ώστε αυτά που παρουσιάζουν διασυστημική δράση να απορροφηθούν από το ριζικό σύστημα των φυτών και να μεταφερθούν και στο υπέργειο τμήμα. Παρουσιάζουν γενικά υψηλή οξεία τοξικότητα και η θέση δράσης τους είναι το νευρικό σύστημα των εντόμων.

1.4.1 Χημική δομή των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Από άποψη χημικής δομής οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι προϊόντα του πεντασθενούς τετραεδρικού φωσφόρου. Οι οργανοφωσφορικοί εστέρες με βάση τη χημική δομή ταξινομούνται σε τρεις κύριες υποομάδες τα αλειφατικά παράγωγα τα αρωματικά και τα ετεροκυκλικά παράγωγα. Ένα σημαντικό μέλος της ομάδας των ετεροκυκλικών παραγόντων είναι το chlorpyrifos. Οι ενώσεις της υποομάδας αυτής χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου με άζωτο, θείο, ή οξυγόνο στο μορίό τους (Ζιώγας Μαρκόγλου 2007)

Ο γενικός τύπος τους παρουσιάζεται στο Σχήμα 2. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου (P). Τα R1 και R2 είναι η αλκυλική ομάδα, η οποία μπορεί να συνδέεται απευθείας σε ένα άτομο φωσφόρου (φωσφινικά) ή μέσω οξυγόνου (φωσφορικών) ή ένα άτομο θείου (φωσφοθειικά). Σε ορισμένες περιπτώσεις, το R1 είναι άμεσα συνδεδεμένο με φώσφορο και το R2 με ένα άτομο οξυγόνου ή θείου. Τουλάχιστον μία από αυτές τις δύο ομάδες είναι συνημμένο με χωρίς-, μονο- ή δι- υποκατεστημένες αμινομάδες σε

φωσφοραμιδικά. Η ομάδα X μπορεί να ανήκει σε ένα ευρύ φάσμα από αλειφατικές, αρωματικές ή ετεροκυκλικές ομάδες (Sogorb & Vilanova, 2002).



Σχήμα 2. Χημική δομή των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων.

1.4.2 Τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Ο τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών ενώσεων περιλαμβάνει την αναστολή των νευροδιαβιβαστών ακετυλοχολίνης. Ακετυλοχολίνη απαιτείται για τη μετάδοση των νευρικών ερεθισμάτων στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες και σε άλλους τομείς (Toole & Toole, 1995). Ωστόσο, μετά τη μετάδοση του παλμού, η ακετυλοχολίνη πρέπει να υδρολύεται για να αποφευχθεί η υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος. Αυτή η κατανομή της ακετυλοχολίνης καταλύεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται ακετυλοχολινεστεράση. Το ένζυμο αυτό μετατρέπει ακετυλοχολίνη σε χολίνη και ακετυλο- CoA με πρόσδεση του υποστρώματος στην ενεργό θέση της σερίνης 203 για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο υποστρώματος ενζύμου. Περαιτέρω αντιδράσεις περιλαμβάνουν την απελευθέρωση της χολίνης από το σύμπλεγμα και στη συνέχεια ταχεία αντίδραση ακυλιωμένων ενζύμων με νερό για την παραγωγή οξικού οξέος και του αναγεννημένου εστέρα ακετυλοχολίνης. Έχει υπολογιστεί ότι ένα ένζυμο μπορεί να υδρολύσει 300.000 μόρια της ακετυλοχολίνης κάθε λεπτό (Ragnarsdottir, 2000).

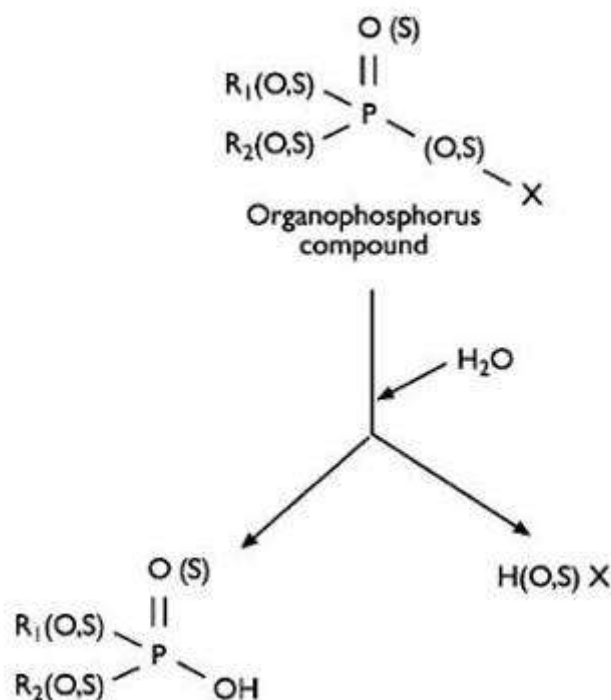
Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των οργανοφωσφορικών ενώσεων στα αρθρόποδα αλλά και στα θηλαστικά είναι η μη αντιστρέψιμη παρεμπόδιση του συστήματος ακετυλοχολίνης – ακετυλοχολινεστεράσης. Τα οργανοφωσφορικά σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο καθώς οι ενώσεις αυτές δεσμεύονται στη θέση σερίνη 203 στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης αντί για την ακετυλοχολίνη που είναι το φυσικό υπόστρωμα. Για τη δράση αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη της ομάδας P=O στο μόριο τους, ενώ για τα

οργανοφωσφορικά με ομάδα $P=S$ όπως το chlorpyrifos πρέπει προηγουμένως να γίνει μετατροπή στο φυτό ή στο έντομο σε $P=O$. Όταν λοιπόν στον οργανισμό του εντόμου εισέλθει κάποιος οργανοφωσφορικός εστέρας τότε γίνεται φωσφορυλίωση του ενζύμου, η φωσφορική ομάδα παραμένει προσκολλημένη στο ένζυμο παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του. Η αναγέννηση των φωσφορυλιωμένων εστέρων ακετυλοχολίνης είναι πολύ αργή και μπορεί να πάρει ώρες ή ημέρες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις συνάψεις, υπεδιέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος του εντόμου (Manahan, 1992). Αυτή η αναστολή προκαλεί σπασμούς, παράλυση και τελικά θάνατο για τα έντομα και θηλαστικά (Ragnarsdottir, 2000).

1.4.3 Μικροβιακή αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα παρουσιάζουν μέτρια υδατοδιαλυτότητα. Η υδρολυτική συμπεριφορά των φωσφορικών εστέρων εξαρτάται από τις ιδιότητες των υποκαταστατών που είναι ενωμένοι με το άτομο του φωσφόρου (ανάλογα με την τάση τους να παίρνουν ή να δίνουν ηλεκτρόνια). Ο δεσμός $P=S$ είναι περισσότερο σταθερός και υδρολύεται δυσκολότερα, γι' αυτό και πολλές αγροχημικές βιομηχανίες στόχευαν στην παρασκευή εντομοκτόνων με αυτή τη δομή. Επίσης, η διάσπαση οργανοφωσφορικών ενώσεων εξαρτάται σημαντικά και από την τιμή του pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται οι ενώσεις.

Οι κύριες αντιδράσεις που εμπλέκονται στη μικροβιακή διάσπαση είναι υδρόλυση, οξείδωση, αλκυλίωση και αποαλκυλίωση (Singh et al, 1999). Η μικροβιακή αποδόμηση μέσω υδρόλυσης, θεωρείται το πιο σημαντικό βήμα στην αποτοξικοποίηση των οργανοφωσφορικών ενώσεων (Εικόνα 1). Με την υδρόλυση του μορίου των οργανοφωσφορικών η ομάδα X που, είναι γνωστή ως αποχωρούσα ομάδα, απελευθερώνεται από το φώσφορο.



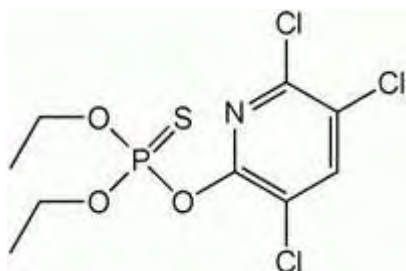
Εικόνα 1. Υδρόλυση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων (Brajesh Singh and Allan Walker 2006).

1.5 Chlorpyrifos

Το chlorpyrifos (O, O-διαίθυλο O-3,5,6-τριχλωροπυριδιν-2-υλίο) είναι ένα κρυσταλλικό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο. Ανήκει στην φωσφοροθειοϊκή (ονομάζεται επίσης και θειοφωσφορικό) ομάδα, που περιλαμβάνει οργανοφωσφορικές ενώσεις που περιέχουν την δομή P=S. Ο χημικός τύπος του chlorpyrifos δίνεται στο Σχήμα 3.

Η εφαρμογή του σε οργανισμούς-στόχους δηλαδή έντομα προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα δρώντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων αναστέλλοντας την λειτουργία της ακετυλοχολίνης που οδηγεί στον θάνατο των εντόμων. Εισήχθη στην αγορά το 1965 από την Dow Chemical Company. Δεν είναι φυτοτοξικό στα περισσότερα είδη φυτών αν χρησιμοποιείται σύμφωνα με την εγκεκριμένη γεωργική πρακτική αλλά είναι μετρίως τοξικό για τον άνθρωπο και η χρόνια έκθεση στο chlorpyrifos έχει συνδεθεί με νευρολογικές επιπτώσεις, αναπτυξιακές διαταραχές, και αυτοάνοσες

διαταραχές. Η έκθεση κατά την εγκυμοσύνη επιβραδύνει την πνευματική ανάπτυξη των παιδιών, και η χρήση του σε οικιακές εργασίες σε σπίτια έχει απαγορευτεί από το 2001 στις ΗΠΑ. Στον τομέα της γεωργίας, παραμένει "ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα", σύμφωνα με το Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US EPA).



Σχήμα 3. Χημικός τύπος του chlorpyrifos

Το chlorpyrifos είναι αποτελεσματικό έναντι ενός ευρέως φάσματος επιβλαβών εντόμων. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο κουνουπιών (προνύμφες και ενήλικα), μυγών και ψύλλων. Επίσης, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο εκτοπαρασίτων σε βοοειδή και πρόβατα. Βρίσκει εκτεταμένη χρήση στη γεωργία σε καλλιέργειες φρούτων και λαχανικών, δημητριακών, βαμβακιού κ.α. Στην αγορά είναι διαθέσιμο σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα, όπως Dursban, Pyrifos, Aspida, Pyrinex, Cyren, ο αριθμός των οποίων έχει μειωθεί δεδομένου ότι σε αρκετά έχει ανακληθεί η έγκριση κυκλοφορίας τους. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται σε πλήθος καλλιεργειών μεταξύ αυτών και σε καλλιέργειας πατάτας για την καταπολέμηση του σιδηροσκούληκου (*Agriotes* sp).

Όσον αφορά τις ιδιότητες του, το chlorpyrifos, εντοπίζεται με την μορφή λευκών κρυστάλλων, έχει την χαρακτηριστική οσμή της μερκαπτάνης και είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, παρουσιάζει μικρή πτητικότητα (1,43 mPa), έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (2 mg /L) σε αντίθεση με την υψηλή διαλυτότητα του σε οργανικούς διαλύτες όπως αιθανόλη, μεθανόλη και διχλωρομεθάνιο (>45g/100g). Έχει υψηλό συντελεστή προσρόφησης στο έδαφος (Racke , 1993) και είναι σταθερό υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης .Το μοριακό του βάρος είναι 350.89 g mol⁻¹ . Έχει σημείο τήξης στους 41.5 °C και σημείο

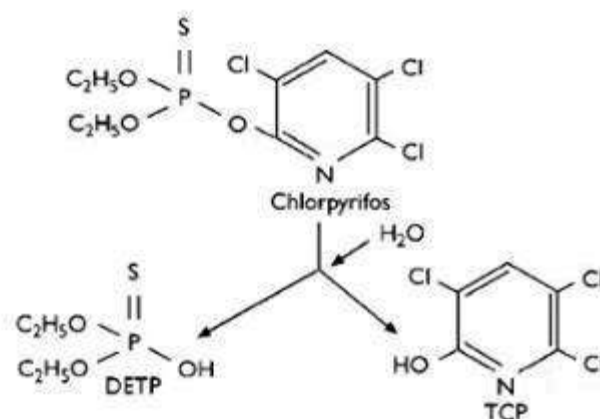
βρασμού στους 200 °C Το Chlorpyrifos ορίζεται ως μέτρια τοξική ένωση με LD50 από του στόματος: 135 - 163 mg/ kg για αρουραίους και 500 mg /kg για ινδικό χοιρίδιο.

Η περιβαλλοντική τύχη του chlorpyrifos έχει μελετηθεί εκτενώς. Η αποδόμηση στο έδαφος πραγματοποιείται με συνδυασμό αβιοτικών και βιοτικών διεργασιών. Ο χρόνος ημιζωής (DT50) του chlorpyrifos στο έδαφος κυμαίνεται από 10 έως 120 ημέρες (Singh and Walker 2006), με την 3,5,6- τριχλωρο-2-πυριδινόλη (TCP) να αποτελεί το κύριο προϊόν αποδόμησης. Αυτή η μεγάλη διακύμανση στο χρόνο ζωής έχει αποδοθεί σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι πιο σημαντικοί από τους οποίους είναι το pH του εδάφους, η θερμοκρασία, η υγρασία που περιέχεται, η περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και το είδος του σκεύασματος (Singh and Walker 2006). Σε αντίθεση με άλλες οργανοφωσφορικές ενώσεις, το chlorpyrifos έχει αναφερθεί να είναι ανθεκτικό στο φαινόμενο της ενισχυμένης βιοαποδόμησης (Racke et al., 1990). Επίσης σε πειράματα που ακουλούθησαν παρατηρήθηκε ταχεία αποδόμηση του chlorpyrifos σε εδάφη με αλκαλικό pH, ενώ αντίθετα σε όξινα εδάφη παρατηρήθηκε βραδεία αποδόμηση του εντομοκτόνου. Επομένως, ο ρυθμός αποδόμησης του chlorpyrifos αυξάνεται σημαντικά με αύξηση του pH του εδάφους.

1.5.1 Μικροβιακή βιοαποδόμηση chlorpyrifos

Ο ρυθμός αποδόμησης των εντομοκτόνων στο έδαφος επηρεάζεται από παράγοντες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία, η μορφή του σκεύασματος με το οποίο έγινε η επέμβαση και τέλος η ύπαρξη μικροοργανισμών.

Στο έδαφος οι κυριότερες διεργασίες απομάκρυνσης του chlorpyrifos είναι η αβιοτική υδρόλυση και η μικροβιακή αποδόμηση. Κάτω από αερόβιες συνθήκες ο κύριος παραγόμενος μεταβολίτης είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) (88,5%) και σε χαμηλότερη ποσότητα οι μεταβολίτες 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) (32,5%) και ο 3,5,6-trichloro-2-methoxyxypyrimidine (TMP) (10,7%). Ενώ κάτω από αναερόβιες συνθήκες παράγεται σε μεγάλο ποσοστό ο μεταβολίτης TCP και σε μικρότερο ποσοστό το CO₂ ενώ δεν παράγεται καθόλου TMP (Bidlack 1979).



Σχήμα 4. Μικροβιακή αποδόμηση chlorpyrifos.

Τα αποτελέσματα μελετών βιοαποδόμησης του chlorpyrifos απέδειξαν πως η δράση των μικροοργανισμών βασίζεται στη διάσπαση του ετεροκυκλικού δακτυλίου (Bidlack 1979, Getzin 1981a, Somasundaram et al, 1987 and Rack et al 1988, 1990). Το πλέον συχνό μονοπάτι βιοαποδόμησης του chlorpyrifos είναι εκείνο κατά το οποίο το μητρικό μόριο υδρολύεται προς TCP (Σχήμα 4).

Ο Thiegs (1966) ανέφερε πως η αποδόμηση του chlorpyrifos παρουσίασε βραδύτερο ρυθμό σε αποστειρωμένο άμμο-πηλώδες έδαφος σε σύγκριση με την αποδόμηση του σε μη αποστειρωμένο έδαφος, αν και η παραγωγή του μεταβολίτη TCP έλαβε χώρα και στις δύο περιπτώσεις. Οι Munnecke et al (1975) παρατήρησαν πως η υδρολάση του parathion (OPD) που είχε απομονωθεί από μια μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών είχε την ικανότητα να υδρολύει και το chlorpyrifos. Οι Singh et al (2004) ανέφεραν την απομόνωση ενός *Enterobacter* στέλεχος B-14 το οποίο είχε την ικανότητα να υδρολύει το chlorpyrifos προς diethylthiophosphoric acid (DETP) και TCP και να χρησιμοποιεί το πρώτο ως πηγή C και P. Η συγκεκριμένη διεργασία οδηγεί στην υδρόλυση του chlorpyrifos από το περιβάλλον αλλά οδηγεί στην συσσώρευση ενός προϊόντος μεταβολισμού, του TCP, το οποίο εμφανίζει τοξικότητα στους μικροοργανισμούς του εδάφους (Richins και άλλοι, 1997, Mallick και άλλοι, 1999, Horne και άλλοι, 2002β, Wang και άλλοι, 2002b). Σύμφωνα με άλλες μελέτες έχουν απομονωθεί βακτήρια που υδρολύουν περαιτέρω το TCP και το DETP. Οι Cook et al (1978a) απομόνωσαν αρκετά βακτήρια από λυματολάσπη

που ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσουν το DETP ως μοναδική πηγή φωσφόρου. Επίσης ένας από αυτούς τους μικροοργανισμούς, το *Pseudomonas acidovorans*, ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσει DETP ως πηγή θείου (Cook και άλλοι, 1980). Οι Feng et al (1997) ανέφεραν τον μεταβολισμό του TCP από ένα στέλεχος *Pseudomonas sp* με διεργασίες αποχλωρίωσης σε αναγωγικές συνθήκες. Σε αυτή τη διαδικασία, το TCP αρχικά αποχλωριώνεται σε χλωροδιυδρο-2-πυριδόνη, το οποίο περαιτέρω αποχλωριώνεται σε τετρα-υδρο-2-πυριδόνη και στο τέλος μεταβολίζεται σε νερό, CO₂, και ιόντα αμμωνίου.

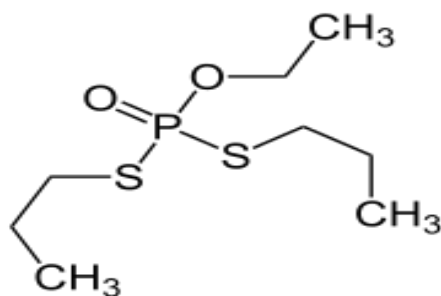
Το chlorpyrifos έχει αναφερθεί να είναι ανθεκτικό στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης (Racke et al., 1990). Προτάθηκε ότι η συσσώρευση του TCP, η οποία έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες, δρα ως ρυθμιστικό στο έδαφος και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών που αποδομούν το chlorpyrifos (Racke et al, 1990).

1.6 Ethoprophos

Το Ethoprophos (Ο-αίθυλο-S, S-διπρόπυλο-φωσφοροδιθειοικό) είναι οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο και νηματοδοκτόνο που ανήκει στην ομάδα των θειοφωσφορικών αλειφατικών οργανοφωσφορικών. Ανακαλύφθηκε το 1966 από την εταιρία Rhone-Poulenc. Στην αγορά κυκλοφορεί με διάφορες εμπορικές ονομασίες μια από αυτές είναι το Mocar®. Σαν οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο δρα ως αναστολέας της ακετυλοχολίνης μποκάροντας το νευρικό σύστημα των εντόμων που προσβάλλει. Εφαρμόζεται πριν ή κατά την διάρκεια της φύτευσης σε βάθος 10-15 cm από την επιφάνεια του εδάφους. Δεν είναι φυτοτοξικό αν εφαρμόζεται σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσεις, είναι όμως εξαιρετικά τοξικό στα θηλαστικά κατά την απορρόφιση μέσω του δέρματος και την εισπνοή. Παράλληλα είναι τοξικό μέσω της στοματικής κοιλότητας και η πιθανή στοματική θανατηφόρα δόση για τους ανθρώπους είναι 5-50 mg/kg. Το ethoprophos χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες καλλωπιστικών φυτών, πατάτας, γλυκοπατάτας, ντομάτας, λαχανικών, καλαμπόκιού καθώς επίσης στα φιστίκια, φράουλες, εσπεριδοειδή, καπνός, μπανάνες, ανανάδες και ζαχαροκάλαμο. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται κυρίως σε περιοχές καλλιέργειας πατάτας για την καταπολέμηση των κυστωδών νηματωδών

(*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) αλλά και εν μέρη για την καταπολέμηση του σιδηροσκούληκου (*Agriotes* sp.).

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες το ethoprophos είναι ένα κίτρινο υγρό με έντονη οσμή μερκαπτάνης. Το μοριακό του βάρος είναι 242.33. Έχει σημείο βρασμού μεταξύ 86-91 °C. Η σχετική πυκνότητα του είναι 1.094 στους 20 °C. Η διαλυτότητα του στο νερό στους 25°C είναι 750mg/L, ενώ σε ακετόνη, αιθανόλη, ξυλόλιο, 1,2-διχλωροαιθάνιο, διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα, πετρελαιοειδή, και κυκλοεξάνιο η διαλυτότητα είναι >300 g/kg (20). Επίσης είναι πολύ σταθερό σε ουδέτερο και ασθενώς όξινο περιβάλλον. Υδρολύεται ταχέως σε αλκαλικά μέσα. Ο μοριακός τύπος του ethoprophos παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. Χημικός τύπος του ethoprophos

1.6.1 Μικροβιακή βιοαποδόμηση ethoprophos.

Το ethoprophos στο έδαφος εμφανίζει χαμηλή ως μέτρια υπολειμματικότητα με χρόνους ημιζωής που κυμαίνονται από 3 ως 30 ημέρες ανάλογα με το είδος του εδάφους και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Jones and Norris 1998). Όπως συμβαίνει και με άλλα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα, η μικροβιακή αποδόμηση είναι η κυριότερη διεργασία απομάκρυνσης του από το έδαφος. Προηγούμενες μελέτες σε εδάφη από περιοχές πατατοκαλλιέργειας στον ελλαδικό χώρο έδειξαν ότι το συγκεκριμένο νηματωδοκτόνο είναι ευαίσθητο στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης σε εδάφη με μακροχρόνιο ιστορικό χρήσης (Karpouzas et al. 1999a). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του ethoprophos οδήγησε σε μείωση της βιολογικής

αποτελεσματικότητας του (Karpouzas et al. 1999b). Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στην απομόνωση δύο βακτηριακών στελεχών του είδους *Pseudomonas putida* που είχε την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το ethoprophos και να το χρησιμοποιεί ως πηγή C για την αύξηση και ανάπτυξη του (Karpouzas et al. 2000).

Από διάφορες μεταβολικές μελέτες για το ethoprophos στο έδαφος προκύπτει ότι η αποδόμησή του πραγματοποιείται μέσω της υδρόλυσης του σε O - αίθυλο - S - πρόπυλο- οξύ ή σε O - αίθυλο - S - πρόπυλο - φωσφοροδιθειϊκό οξύ. Αυτά τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε φυσιολογικά γεωργικά εδάφη στα οποία το ethoprophos ήταν αρκετά σταθερό (Jones and Norris 1998, Karpouzas et al. 2000).

1.7. Σκοπός του πειράματος

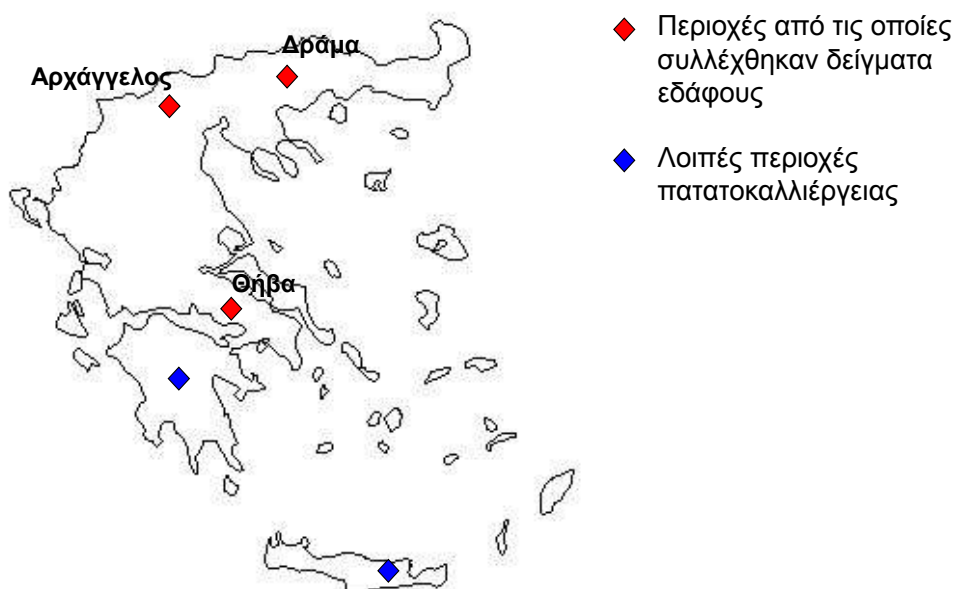
Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της υπολειμματικότητας των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων ethoprophos και chlorpyrifos σε εδάφη από περιοχές καλλιέργειας πατάτας με ιστορικό χρήσης ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι εκτεταμένο ή όχι είναι το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης των δύο αυτών οργανοφωσφορικών σε περιοχές μονοκαλλιέργειας πατάτας στον Ελλαδικό χώρος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδαφών

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τρεις περιοχές καλλιέργειας πατάτας, Οροπέδιο Νευροκοπίου Δράμας, Θήβα και Αρχάγγελος, με ιστορικό χρήσης των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Οι κυριότερες περιοχές πατατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα και οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκαν τα δείγματα

Από την περιοχή της Θήβας συλλέχθηκαν πέντε εδάφη με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων και ένα έδαφος-μάρτυρας χωρίς προηγούμενο ιστορικό χρήσης. Γενικότερα στην περιοχή της Θήβας το κυριότερο πρόβλημα αποτελούν οι προσβολές από σιδηροσκούληκο, για το λόγο αυτό τα εδάφη που συλλέχθηκαν είχαν κυρίως ιστορικό χρήσης ethoprophos και chlorpyrifos (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θήβας.

Έδαφος	Ιστορικό γεωργικών φαρμάκων	Ιστορικό καλλιέργειας
Θήβα 1	Ethoprophos, chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2013 πατάτα
Θήβα 2	Ethoprophos, chlorpyrifos (3 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	Ethoprophos (2 εφαρμογές)	2012 κρεμμύδι
	-	2011 σιτάρι
	?????	2010 πατάτα
Θήβα 3	Ethoprophos, chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2011 κρεμμύδι
	-	2010 σιτάρι
Θήβα 4	Ethoprophos, chlorpyrifos (3 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2011 κρεμμύδι
	-	2010 σιτάρι
Θήβα 5	Ethoprophos, chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2013 πατάτα
	Chlorpyrifos (2 εφαρμογές)	2012 κρεμμύδι
	-	2011 σιτάρι
	?????	2010 πατάτα
Μάρτυρας	-	Όχι πατατα

Από το οροπέδιο Νευροκοπίου Δράμας συλλέχθηκαν πέντε δείγματα με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων και ένα έδαφος μάρτυρας χωρίς

ιστορικό χρήσης με τα εν λόγω γεωργικά φάρμακα. Στην περιοχή του Νευροκοπίου σημαντικό πρόβλημα αποτελούν τόσο οι νηματώδεις όσο και το σιδηροσκούληκο με αποτέλεσμα να βρεθούν αγροί με ιστορικό χρήσης ethoprophos και fosthiazate που χρησιμοποιούνται κυρίως για την καταπολέμηση των νηματωδών ενώ για την καταπολέμηση του σιδηροσκούληκου γίνεται εκτεταμένη χρήση του chlorpyrifos ως και δύο φορές ανά έτος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε δύο από τους αγρούς που συλλέχθηκε έδαφος (Νευροκόπι 3 & Νευροκόπι 4) παρατηρήθηκε (σύμφωνα με τον παραγωγό) μειωμένη αποτελεσματικότητα στην καταπολέμηση κυρίως των νηματωδών κατά την τελευταία καλλιεργητική περίοδο (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη που συλλέχθηκαν από το οροπέδιο του Νευροκοπίου.

Έδαφος	Ιστορικό γεωργικών φαρμάκων	Ιστορικό καλλιέργειας
Μάρτυρας	-	2013 τριφύλλι
	-	2012 χέρσο
	-	2011 τριφύλλι
	-	Όχι πατάτα από 2008
Νευροκόπι 1	-	2013 χέρσο
	Ethoprophos 6 kg/στρ (περιορισμένη αποτελεσματικότητα)	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
	Ethoprophos	2010 πατάτα
	-	2009 σιτάρι
	Ethoprophos	2008 πατάτα
Νευροκόπι 2	Chlorpyrifos, fosthiazate	2013 πατάτα
	Chlorpyrifos, fosthiazate	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
	Chlorpyrifos, fosthiazate	2010 πατάτα

	-	2009 σιτάρι
	Carbofuran, chlorpyrifos, fosthiazate	2008 πατάτα
Νευροκόπι 3	Ethoprophos + fosthiazate από 4 kg/στρ (μειωμένη αποτελεσματικότητα)	2013 πατάτα
	Ethoprophos + fosthiazate από 4 kg/στρ	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
	Ethoprophos + fosthiazate από 4 kg/στρ	2012 πατάτα
	-	2011 σιτάρι
Νευροκόπι 4	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2011 πατάτα
	-	2010 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), Fosthiazate + ethoprophos	2009 πατάτα
Νευροκόπι 5	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2011 πατάτα
	-	2010 σιτάρι
	Chlorpyrifos (2 φορές), fosthiazate + ethoprophos	2009 πατάτα

Από την περιοχή πατατοκαλλιέργειας του **Αρχαγγέλου** συλλέχθηκαν τέσσερα εδάφη με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων και ένα έδαφος-μάρτυρας χωρίς προηγούμενο ιστορικό χρήσης. Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Αρχαγγέλου τα εδάφη παρουσίαζαν κυρίως ιστορικό χρήσης του chlorpyrifos και fipronil, ενώ παλαιότερα γινόταν και εφαρμογή του ethoprophos (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Ιστορικό χρήσης γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Αρχαγγέλου.

Έδαφος	Ιστορικό γεωργικών φαρμάκων	Ιστορικό καλλιέργειας
Αρχάγγελος 1 Βόρεια	Chlorpyrifos, fipronil	2013 πατάτα
	-	2012 χέρσο
	-	2012 χέρσο
	Ethoprophos, chlorpyrifos	2010 πατάτα
Αρχάγγελος 2 Βόρεια	chlorpyrifos	2013 πατάτα
	-	2012 φασόλι
	-	2011 σιτάρι
Μάρτυρας	-	Ακαλλιέργητο τα τελευταία χρόνια
Αρχάγγελος 4 Νότια	Fipronil	2013 πατάτα
	-	2012 καλαμπόκι
	-	2011 καλαμπόκι
Αρχάγγελος 5 Νότια	fipronil	2013 πατάτα
	-	2012 σιτάρι
	Chlorpyrifos	2011 πατάτα

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών.

Τα εδάφη αφού μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο κοσκινίστηκαν και στην συνέχεια υποδείγματα των 50-200 g χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της υγρασίας και υδατοχωρητικότητας τους αλλά και των κυριοτέρων φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό C και μηχανική σύσταση όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2.1 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας, $5 \pm 0.01\text{g}$ εδάφους μεταφέρθηκαν σε προ-ζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο και το συνολικό βάρος καταγράφηκε. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Αμέσως μετά, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°C , όπου και παρέμειναν για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναζυγίστηκαν και προσδιορίστηκε η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{MC} = [(W_1 - W_2) * 100\%] / (W_2 - W_{\text{cont}})$$

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

W1: το βάρος του δοχείου με το έδαφος πριν την ξήρανση

W2: το βάρος του δοχείου με το έδαφος μετά την ξήρανση

Wcont: το βάρος του δοχείου.

2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας έγινε βαρομετρικά. Συγκεκριμένα, 20g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε χωνί εντός του οποίου είχε προηγουμένως τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Στη συνέχεια το έδαφος διαβρέχτηκε επανειλημμένα με αποσταγμένο νερό προκειμένου να διασφαλιστεί ο κορεσμός του. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης. Το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία 12-14 ώρες ώστε να στραγγίσει η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε πριν (W_1) και μετά (W_2) την κατάκλιση. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{WHC} = (B - X) + (W_2 - W_1) / X * 100\%$$

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

W₁: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση

W₂: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.2.3 Προσδιορισμός pH, περιεκτικότητας σε οργανικό C και μηχανικής σύστασης

Για τον προσδιορισμό του pH των εδαφών 10 g εδάφους (ξηρό βάρος) ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 25 ml απεσταγμένου νερού (αναλογία 1:2.5 β/ο) και πραγματοποιήθηκε ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθησε μέτρηση σε πεχάμετρο υψηλής ευκρίνειας (HANNA pH 211) με προσαρτημένο ηλεκτρόδιο (METTLER TOLEDO 412). Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα και της μηχανικής σύστασης των εδαφών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εδαφολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης από την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ματσή. Πιο συγκεκριμένα ο προσδιορισμός του περιεχόμενου οργανικού άνθρακα έγινε σύμφωνα με τους Walkley and Black, (1934) και η μηχανική σύσταση προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bouyoucos (Sheldrick and Wang, 1993).

2.2.4 Αποτελέσματα των εδαφολογικών αναλύσεων

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 (Θήβα), 5 (Νευροκόπι) και 6 (Αρχάγγελος).

Πίνακας 4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θήβας.

Έδαφη	pH	Οργανικός άνθρακας (%)	Άργιλος (%)	Ίλος (%)	Άμμος (%)	Τύπος εδάφους
Μάρτυρας Θήβα	8,21	0,32	17,6	24	58,4	Αμμοπηλώδες
Θήβα 1	8,33	0,74	21,6	26	52,4	Αμμο-αργιλο- πυλώδες
Θήβα 2	8,01	0,93	23,6	32	44,4	Πηλώδες
Θήβα 3	8,01	0,62	23,6	32	44,4	Πηλώδες
Θήβα 4	7,85	1,17	29,6	28	42,4	Αργιλοπηλώδες
Θήβα 5	8,10	0,78	37,6	26	36,4	Αργιλοπηλώδες

Τα εδάφη από την Θήβα παρουσιάζουν όλα αλκαλικό pH και χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (<1% εκτός του Θήβα 4) και χαρακτηρίζονται ως αμμοπηλώδη - αργιλοπηλώδη.

Πίνακας 5. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από το Οροπέδιο του Νευροκοπίου.

Εδάφη	pH	Οργανικός άνθρακας (%)	Άργιλος (%)	Ίλος (%)	Άμμος (%)	Τύπος εδάφους
Μάρτυρας Νευροκόπι	5,17	1,99	21,6	36	42,4	Πηλώδες
Νευροκόπι 1	6,01	0,98	37,6	24	38,4	Αργιλοπηλώδες
Νευροκόπι 2	5,23	0,42	11,6	24	64,4	Αμμοπηλώδες
Νευροκόπι 3	6,80	0,61	9,6	22	68,4	Αμμοπηλώδες
Νευροκόπι 4	6,60	0,85	13,6	20	66,4	Αμμοπηλώδες
Νευροκόπι 5	6,23	1,12	41,6	30	28,4	Αργιλώδες

Τα εδάφη από το οροπέδιο του Νευροκοπίου παρουσιάζουν όξινο ως ουδέτερο pH (5.2 – 6.8), χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό C (0.42 – 1.12%) με εξαίρεση το έδαφος Νευροκόπι μάρτυρας που εμφανίζει περιεκτικότητα σε οργανικό C 2%. Τα συγκεκριμένα είναι πηλώδη, αμμοπηλώδη, αργιλοπηλώδη με μοναδική εξαίρεση το έδαφος Νευροκόπι 5 που χαρακτηρίζεται ως αργιλώδες.

Πίνακας 6. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από την περιοχή του Αρχαγγέλου.

Έδαφος	pH	Οργανικό ς άνθρακας (%)	Άργιλο ς (%)	Ίλος (%)	Άμμος (%)	Τύπος εδάφους
Μάρτυρας Αρχαγγέλου	7,11	1,21	25,6	30	44,4	Πηλώδες
Αρχάγγελος 1	6,22	1,91	21,6	34	44,4	Πηλώδες
Αρχάγγελος 2	4,96	1,80	23,6	42	34,4	Πηλώδες
Αρχάγγελος 4	7,90	0,87	11,6	50	38,4	Ιλυοπηλώδες/Πηλ ώδες
Αρχάγγελος 5	7,42	2,80	17,6	36	46,4	Πηλώδες

Τα εδάφη από την περιοχή του Αρχαγγέλου χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα όξινα (pH 4.96 Αρχάγγελος 2) ως αλκαλικά (pH 7.90, Αρχάγγελος 4), με υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανικό C σε σχέση με τα εδάφη από τις υπόλοιπες περιοχές (OC>1% εκτός Αρχαγγέλου 4). Τα συγκεκριμένα εδάφη παρουσιάζουν παρόμοια μηχανική σύσταση και χαρακτηρίζονται όλα ως πηλώδη.

2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και γεωργικά φάρμακα

Για την πραγματοποίηση του πειράματος προετοιμάστηκε υδατικό διάλυμα του chlorpyrifos συγκέντρωσης 120 mg L^{-1} , από το εμπορικό σκεύασμα DURSABAN 20% EC. Αντίθετα για το ethionphos δεν υπήρχε διαθέσιμο υγρό σκεύασμα και για την εφαρμογή του στα εδάφη προετοιμάστηκε διάλυμα σε μεθανόλη (300 μg/ml) χρησιμοποιώντας πρότυπη ουσία υψηλής καθαρότητας. Για τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό HPLC grade (Merck), ορθο-φωσφορικό οξύ (Panreac, 85% PA-ACS-ISO), ανυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4 98+%, CHEM-LAB), χλωριούχο νάτριο (NaCl AppliChem 99,5%), sodium citrate-tri basic ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, AppliChem 99-100%) και PSA (Agilent Technologies).

2.4 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος

2.4.1 Εκχύλιση chlorpyrifos από το έδαφος

Για την εκχύλιση του chlorpyrifos και του μεταβολίτη TCP από το έδαφος, 2 g εδάφους μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 100 ml, όπου προστέθηκαν 9,8 ml

μεθανόλης, 0,1ml H₂O και 0,1 ml ορθό-φωσφορικού οξέος. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν στη συνέχεια για 10 min σε λουτρό υπερήχων και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα (orbital shaker) για 2 ώρες, σε 190 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του μίγματος για 10 min σε 4500 rpm και παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος, το οποίο διηθήθηκε στη συνέχεια από ειδικό οξοανθεκτικό φίλτρο (glass fibre filters) προκειμένου να αναλυθεί σε σύστημα HPLC.

2.4.2 Εκχύλιση ethoprophos από το έδαφος

Η παραλαβή των ethoprophos από το έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο QuEChERS (Asensio-Ramos et al., 2010). Η μέθοδος QuEChERS περιλαμβάνει δύο επιμέρους στάδια: (1) το στάδιο της εκχύλισης και (2) το στάδιο του καθαρισμού. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, 10 g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα Teflon χωρητικότητας 50ml, με καπάκι, όπου προστέθηκαν 20ml διαλύτη ακετονιτρίλιου και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε μίγμα αλάτων αποτελούμενο από 4g άνυδρο MgSO₄, 1g NaCl και 1.5g C₆H₅Na₃O₇ · 2 H₂O και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min, παραμονή για 5 min σε λουτρό υπερήχων (sonicator) και φυγοκέντρηση για 8 min σε 4000 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε καθαρισμό. Συγκεκριμένα, κλάσμα όγκου 4 ml από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωλήνα Teflon που περιείχε 600mg MgSO₄ and 100mg PSA και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex για 30 sec, παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 1min και φυγοκέντρηση για 10 min σε 4400 rpm. Κατόπιν το δείγμα διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας 0.45μm για να ακολουθήσει η χρωματογραφική ανάλυση του.

Για όλα τα γεωργικά φάρμακα που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκαν τεστ ανάκτησης σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (0.1, 1 και 5 mg/kg) σε ένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν, για να δοκιμαστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της κάθε μεθόδου. Σε όλα τα τεστ τα επίπεδα ανάκτησης ήταν ικανοποιητικά και κυμάνθηκαν από 81 ως 103%.

2.5 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των εκχυλισμάτων σε σύστημα HPLC Marathon III, με UV ανιχνευτή και στήλη C18 GraceSmart (4.6 mm x 150mm, 5 μ m). Σε κάθε περίπτωση, ο όγκος της έγχυσης ήταν 20 μ l. Για τη διασφάλιση της καθαρότητας των προς ανάλυση δειγμάτων, πριν την έγχυση στο χρωματογράφο, τα δείγματα της κάθε μεταχείρισης διηθούνταν από ειδικά φίλτρα σύριγγας 0.45 μ m (Syringe Filters, LabSolution). Η ροή της κινητής φάσης ήταν σε κάθε περίπτωση 1 ml min⁻¹. Η έκλουση του ethoprophos, πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά, ενώ στην περίπτωση των chlorpyrifos και TCP πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή έκλουση, με αλλαγή της κινητής φάσης από 100% B [ακετονιτρίλιο + H₂O + ορθό-φωσφορικό οξύ (30+70+0,1 κ.ο.)] σε 100% A [ακετονιτρίλιο + H₂O+ ορθό-φωσφορικό οξύ (80+20+0,1 κ.ο.)] σε 11 min. Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για το ethoprophos και το chlorpyrifos περιγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 8 ενώ το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό του chlorpyrifos και του TCP παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 8. Συνθήκες ανάλυσης των υπό μελέτη γεωργικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

Γεωργικά φάρμακα	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)
Ethoprophos	ACN:H ₂ O	65:35	226
Chlorpyrifos	ACN:H ₂ O +0,1 % <i>ortho</i> -phosphoric acid	A. 80:20 B. 30:70	230

Πίνακας 9. Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης των chlorpyrifos και TCP

Χρόνος (min)	A(%)	B(%)	Pοή ml/min
Initial	0	100	1
1,0	0	100	1
3,0	100	0	1
11,0	100	0	1
13,0	0	100	1

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα εδάφους ήταν απαραίτητη η κατασκευή και η χρήση πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα 1000 µg/ml σε μεθανόλη για το ethoprophos, το chlorpyrifos καθώς και για το μεταβολίτη του trichloropyridinyl (TCP). Ακολούθως, από τα αρχικά πρότυπα διαλύματα με κατάλληλες αραιώσεις προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων συγκεντρώσεων από 0.01 ως 10 µg/ml σε μεθανόλη για το chlorpyrifos ενώ για το ethoprophos τα διαλύματα στις συγκεντρώσεις αυτές ήταν κατά το 70% μεθανόλη και 30% νερό έπειτα έγινε έγχυση 20 µl από κάθε ένα από αυτά στο σύστημα HPLC. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το κάθε γεωργικό φάρμακο.

2.6 Περιγραφή πειράματος αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων

Με την παραλαβή τους στο εργαστήριο τα εδάφη αφέθηκαν ώστε να απωλέσουν υγρασία και στην συνέχεια κοσκινήστηκαν ώστε να απομακρυνθούν πέτρες και φυτικά υπολείμματα. Καθένα από τα δείγματα εδάφους στα οποία είχε ήδη προσδιοριστεί η υγρασία και η υδατοχωρητικότητα τους διαχωρίστηκαν σε δύο υποδείγματα των 600 g. Το ένα δείγμα από το κάθε έδαφος δέχτηκε εφαρμογή υδατικού διαλύματος chlorpyrifos ώστε να έχει στο έδαφος συγκέντρωση 2 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους που θα αναμένονταν στο έδαφος (0-10 cm) ύστερα από εφαρμογή των μέγιστων συνιστώμενων δόσεων για την καταπολέμηση εντόμων εδάφους στην πατάτα (GAP documents). Ενώ το άλλο υπό-δείγμα από κάθε έδαφος

δέχτηκε εφαρμογή από πυκνό μεθανολικό διάλυμα ethoprophos ώστε να έχει τελική συγκέντρωση γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος ίση με 5 mg/kg ξηρού βάρους εδάφους. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι εφαρμογές στα εδάφη-μάρτυρες από όλες τις περιοχές και στην συνέχεια ακολούθησαν οι εφαρμογές στα υπόλοιπα εδάφη ώστε να περιοριστεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των εδαφών-μάρτυρες από εδάφη με ιστορικό χρήσης των γεωργικών φαρμάκων.

Αμέσως μετά την εφαρμογή των εντομοκτόνων η υγρασία των δειγμάτων προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων νερού. Ακολούθως τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χέρι ώστε να επιτύχουμε ομοιόμορφη κατανομή του γ.φ. σε όλο τον όγκο του εδάφους και διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα των 30 g (18 δείγματα) τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο και τοποθετήθηκαν σε ψυχόμενο επωαστικό θάλαμο στους 20°C στο σκοτάδι. Στις σακούλες δημιουργήθηκε οπή ώστε να διατηρηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Αμέσως μετά την εφαρμογή (0 ημέρες) και 7, 14, 21, 42 και 70 ημέρες αργότερα τρία δείγματα από κάθε έδαφος και μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση και τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν και να προσδιοριστεί η υπολειπόμενη ποσότητα του ethoprophos και του chlorpyrifos στα εδάφη αυτά.

2.7 Υπολογισμός DT50 στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής (DT50), δηλαδή του χρόνου (σε ημέρες, εβδομάδες ή έτη) που απαιτείται για να διασπασθεί το 50% της αρχικής συγκέντρωσης ενός γεωργικού φαρμάκου, των chlorpyrifos και ethoprophos χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από το FOCUS working group (FOCUS 2006). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT50 χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και δύο μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick, και Bi-exponential) (Πίνακας 10). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής

χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων.

Πίνακας 10: Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής για τη διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής τους.

Μοντέλο	Μαθηματική εξίσωση	Υπολογισμός Ημιζωής
Single first order (linear) (SFO)	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2 / K$
Hockey Stick (HS)	$C = C_0 e^{-K_1 t}$ for $t \leq t_b$	$t_{1/2} = \ln 2 / K_1$
	$C = C_0 e^{-K_1 t} e^{-K_2 (t-t_b)}$ for $t > t_b$	$t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - K_1 t_b) / K_2$
Bi-exponential (DFOP)	$C = C_0 (g e^{-K_1 t} + (1-g) e^{-K_2 t})$	Iterative method

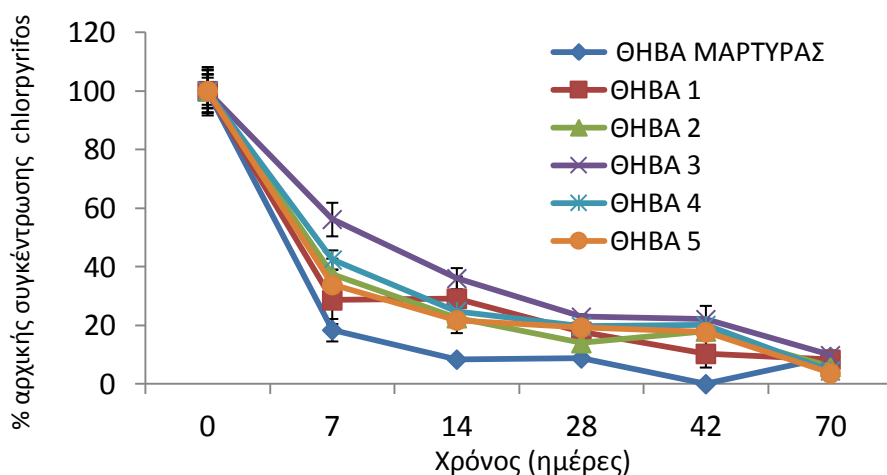
Τα δεδομένα αποδόμησης (DT50) των γ.φ. που μελετήθηκαν συσχετίστηκαν με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών και την ύπαρξη ή όχι ιστορικού χρήσης του κάθε γ.φ. ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην αποδόμηση των γ.φ. που μελετήθηκαν στο έδαφος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

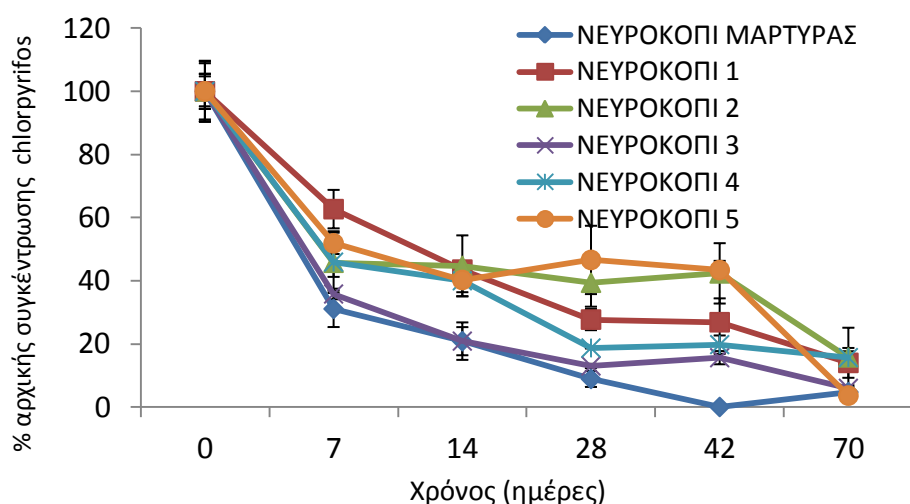
3.1 Αποδόμηση chlorpyrifos

Η αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη από τις περιοχές Θήβας, Νευροκοπίου και Αρχαγγέλου παρουσιάζεται συγκεντρωτικά στα Διαγράμματα 3.1.1, 3.1.2 και 3.1.3 αντίστοιχα.



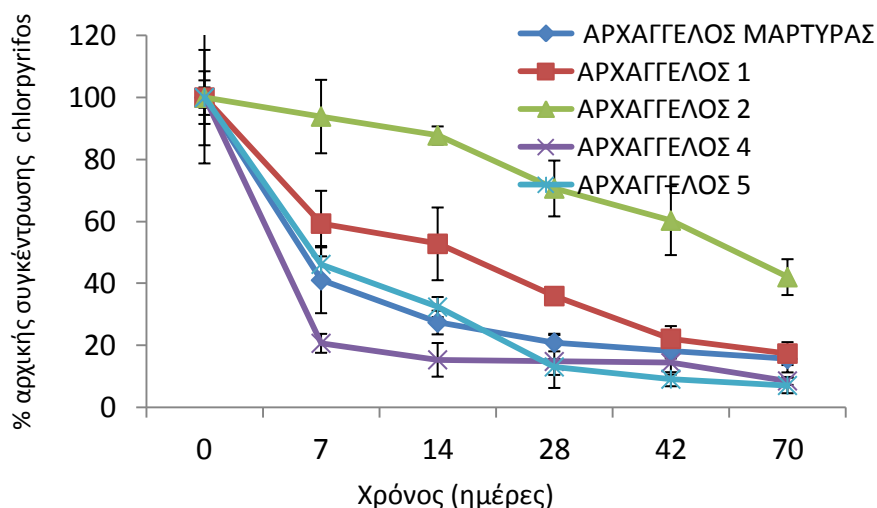
Διάγραμμα 3.1.1 Η αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Στα εδάφη από την Θήβα, που παρουσιάζουν σχετική ομοιογένεια στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, η αποδόμηση του chlorpyrifos δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των εδαφών με ιστορικό χρήσης (όλα τα εδάφη είχαν ιστορικό χρήσης chlorpyrifos) ή χωρίς (Μάρτυρας Θήβα). Σε όλα τα εδάφη παρατηρήθηκε μια ταχεία αποδόμηση του chlorpyrifos κατά τις πρώτες 7 ημέρες με σχετικά πλήρη απομάκρυνση του από όλα τα εδάφη στις 70 ημέρες που διήρκεσε το πείραμα.



Διάγραμμα 3.1.2 Η αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη από το οροπέδιο Νευροκοπίου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Η αποδόμηση του chlorpyrifos παρουσίασε ήταν ταχύτερη στα εδάφη Νευροκόπι 3 και Νευροκόπι Μάρτυρας τα οποία δεν είχαν ιστορικό χρήσης chlorpyrifos σε αντίθεση με τα εδάφη Νευροκόπι 5 και 2 που είχαν ιστορικό χρήση του εντομοκτόνου αλλά η αποδόμηση του chlorpyrifos ήταν βραδύτερη.



Διάγραμμα 3.1.3 Η αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη από τον Αρχάγγελο. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Στα εδάφη από την περιοχή του Αρχαγγέλου παρατηρήθηκαν διαφορές στην αποδόμηση του chlorpyrifos χωρίς όμως αυτές οι διαφορές να εμφανίζουν συσχέτιση με το ιστορικό χρήσης. Έτσι παρατηρήθηκε ταχεία αποδόμηση του chlorpyrifos στο έδαφος Αρχάγγελος 4 (pH: 7,90 και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία: 0,87) που ήταν το πιο αλκαλικό έδαφος από την συγκεκριμένη περιοχή και ταυτόχρονα το μοναδικό έδαφος της περιοχής (μαζί με τον Μάρτυρα) χωρίς ιστορικό χρήσης chlorpyrifos. Αντίθετα η βραδύτερη αποδόμηση του chlorpyrifos παρατηρήθηκε στο έδαφος Αρχάγγελος 2 που χαρακτηρίζεται από όξινο pH (5) σε σχέση με τα υπόλοιπα εδάφη του Αρχαγγέλου και περιεκτικότητα σε οργανική ουσία 1,80%.

3.1.1 Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη που μελετήθηκαν

Η αποδόμηση του chlorpyrifos στα περισσότερα από τα εδάφη που αξιολογήθηκαν δεν περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης με τιμές $\chi^2 > 15\%$. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν τα εδάφη Νευροκόπι 1 και Νευροκόπι μάρτυρας καθώς και τα εδάφη Αρχάγγελος 1, 4 και 5. Στα υπόλοιπα εδάφη αξιολογήθηκε η προσαρμογή των υπόλοιπων μοντέλων κινητικής που προτείνονται από το FOCUS (2006). Το διφασικό μοντέλο Hockey-Stick περιέγραψε με ικανοποιητική ακρίβεια την κινητική αποδόμησης του chlorpyrifos στα υπόλοιπα εδάφη. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν τα εδάφη Νευροκόπι 2 και 5 όπου για την περιγραφή της αποδόμησης του chlorpyrifos χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς το μοντέλο DFOP. Στους Πίνακες 11, 12 και 13 παρουσιάζονται οι τιμές του DT50 και οι λοιπές παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του chlorpyrifos σε κάθε ένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν.

Πίνακας 11. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη της Θήβας σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής Hockey Stick.

Εδάφη	$K_1 (d^{-1})$	$K_2 (d^{-1})$	C_0	t_b	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ^2 (%)
Θήβα 1	0,259	0,024	100	4,33	2,7	52,68	6,4
Θήβα 2	0,141	0,018	100	10,25	4,9	57,9	12,9

Θήβα 3	0,028	0,022	100	12,26	8,6	71,2	12,1
Θήβα 4	0,123	0,0197	100	10,35	5,7	62,92	7,7
Θήβα 5	0,155	0,0196	100	8,63	4,5	57,96	7,8
Θήβα μάρτυρας	0,242	0,0006	100	11,17	2,9	9,53	12,9

Πίνακας 12. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη του Νευροκοπίου σύμφωνα με τα μοντέλα κινητικής πρώτης τάξης (SFO)^(α) Hockey-stick (HS)^(β) και Bi-exponential (DFOP)^(γ)

Εδάφη	K(d ⁻¹)	K ₁ (d ⁻¹)	K ₂ (d ⁻¹)	C ₀	t _b	g	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ ² (%)
Νευροκόπι 1 ^(α)	0,041			92,33			16.8	55,9	13,47
Νευροκόπι 2 ^(γ)		16,31	0,0136	100		0,4542	6.4	124,5	14,10
Νευροκόπι 3 ^(β)		0,147	0,018	100	10,42		4.7	52,87	5,9
Νευροκόπι 4 ^(β)		0,111	0,021	100	8,172		6.2	74,6	12,8
Νευροκόπι 5 ^(γ)		11,68	0,0164	100		0,4006	11.1	109,2	20,06
Νευροκόπι μάρτυρας ^(α)	0,138			98,62			5.0	16,7	14,67

Πίνακας 13. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του chlorpyrifos στα εδάφη του Αρχαγγέλου σύμφωνα με τα μοντέλα κινητικής πρώτης τάξης^(α) και hockey-stick^(β)

Εδάφη	K (d ⁻¹)	K ₁ (d ⁻¹)	K ₂ (d ⁻¹)	C ₀	t _b	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ ² (%)
Αρχάγγελος	0,0350			90,85		19.8	65,74	12,24

1 ^(α)								
Αρχάγγελος 2 ^(β)		0,004	0,013	100	3,898	56.0	179,8	10,1
Αρχάγγελος 4 ^(α)	0,1938			99,34		3.6	11,88	23,79
Αρχάγγελος 5 ^(α)	0,0841			97,06		8.2	27,36	8,236
Αρχάγγελος μάρτυρας ^(β)		0,127	0,011	100	10,26	5.5	101,1	5,0

Γενικότερα το chlorpyrifos παρουσίασε χαμηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που αξιολογήθηκαν με μέση τιμή DT50 = 10.7±12.2 ημέρες. Η χαμηλότερη τιμή DT50 παρατηρήθηκε στο έδαφος Θήβα 1 (2.7 ημέρες) και η υψηλότερη στο έδαφος Αρχάγγελος 2 (56 ημέρες). Στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας παρατηρήθηκε ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση του chlorpyrifos (μέση τιμή DT50 = 5.3 ημέρες) ενώ ακολούθησαν τα εδάφη από το Νευροκόπι (μέση τιμή DT50 = 8.4 ημέρες) και τον Αρχάγγελο (μέση τιμή DT50 = 18.6 ημέρες).

3.1.2 Συσχέτιση DT₅₀ του chlorpyrifos με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποδόμησης (DT50) και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν έδειξε σημαντική αρνητική συσχέτιση ($p < 0.05$) μεταξύ pH και DT50 (Πίνακας 14). Εκτός του pH, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του DT50 του chlorpyrifos και των υπόλοιπων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών.

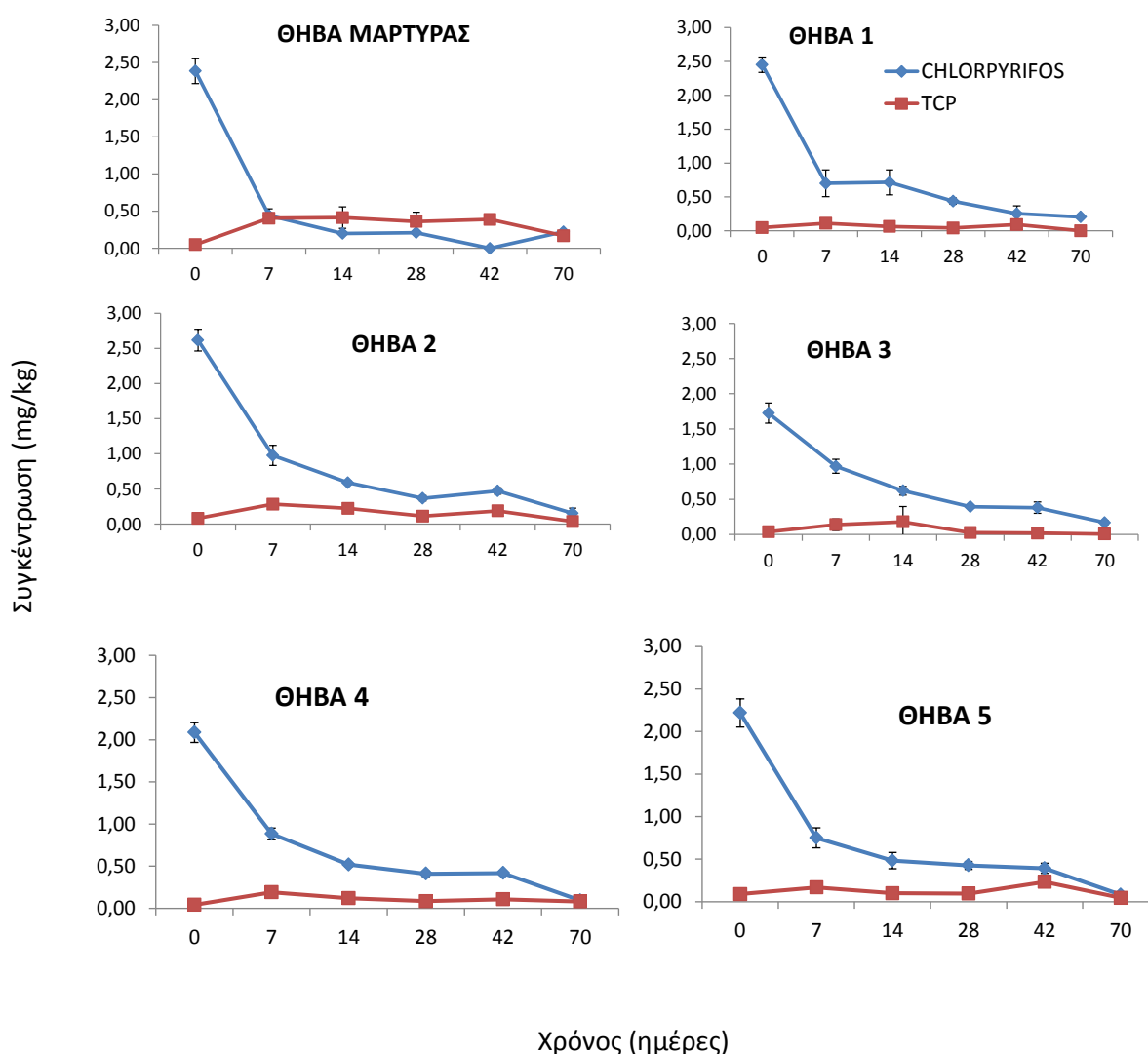
Πίνακας 14. Συσχετίσεις (Pearsons Correlation Test) μεταξύ DT50 του chlorpyrifos και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν

		pH	Οργανικός C	Άργιλος	Ιλυσ	Άμμος
DT50	Συντελεστής Συσχέτισης (r)	-0,566*	0,377	0,155	0,366	-0,370

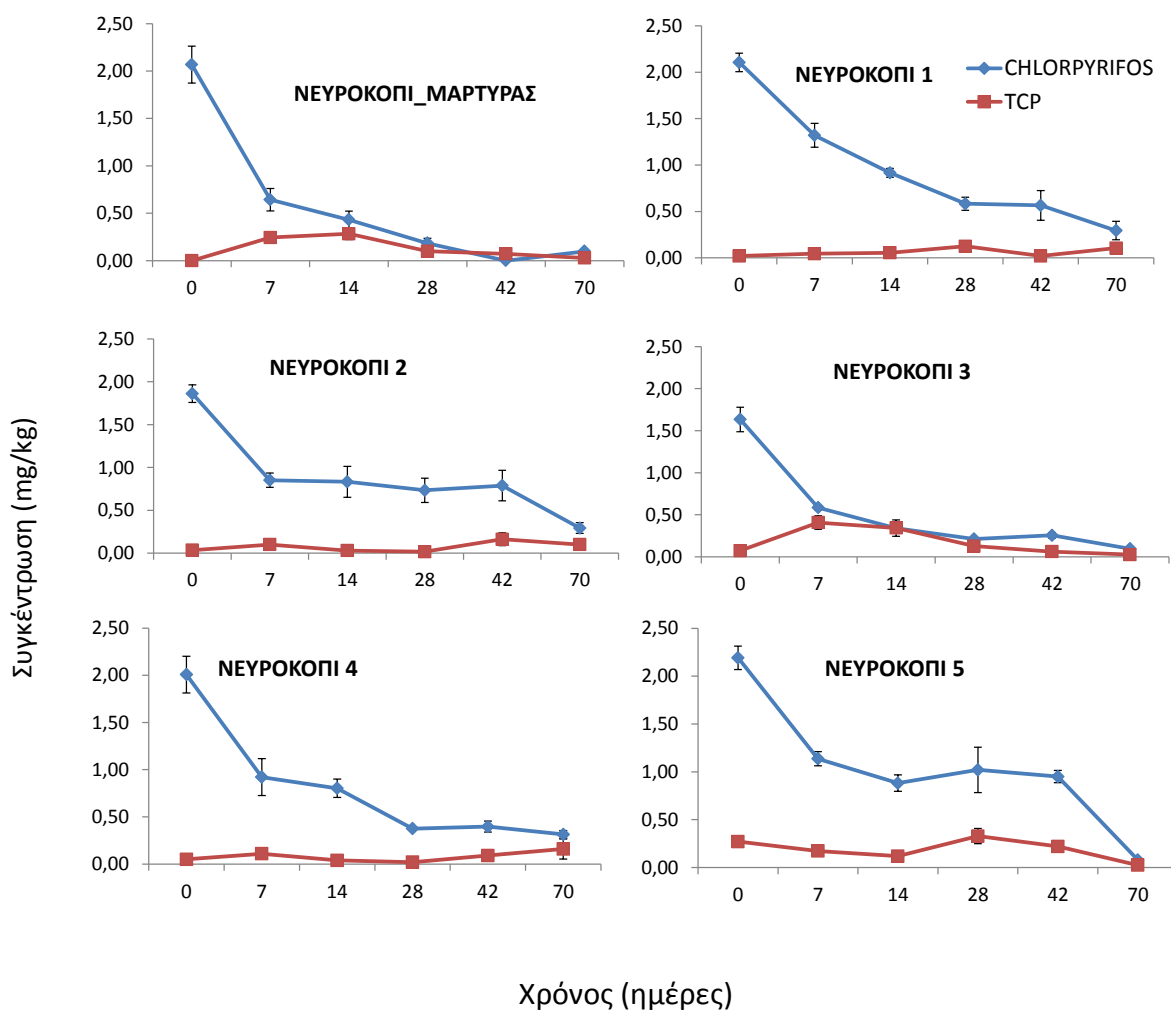
	Πιθανότητες (p)	0,018	0,135	0,554	0,149	0,144
--	-----------------	--------------	-------	-------	-------	-------

3.1.3 Ο μεταβολισμός του chlorpyrifos στα εδάφη

Η αποδόμηση του chlorpyrifos συνοδεύτηκε από την παραγωγή TCP που όμως δεν φαίνεται να συσσωρεύεται σε κανένα από τα εδάφη που μελετήθηκαν. Το πρότυπο παραγωγής του TCP παρουσίασε διαφορές από έδαφος σε έδαφος. Τα αποτελέσματα αποδόμησης του chlorpyrifos και σχηματισμού του TCP παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.1.3α, 3.1.3β, 3.1.3γ

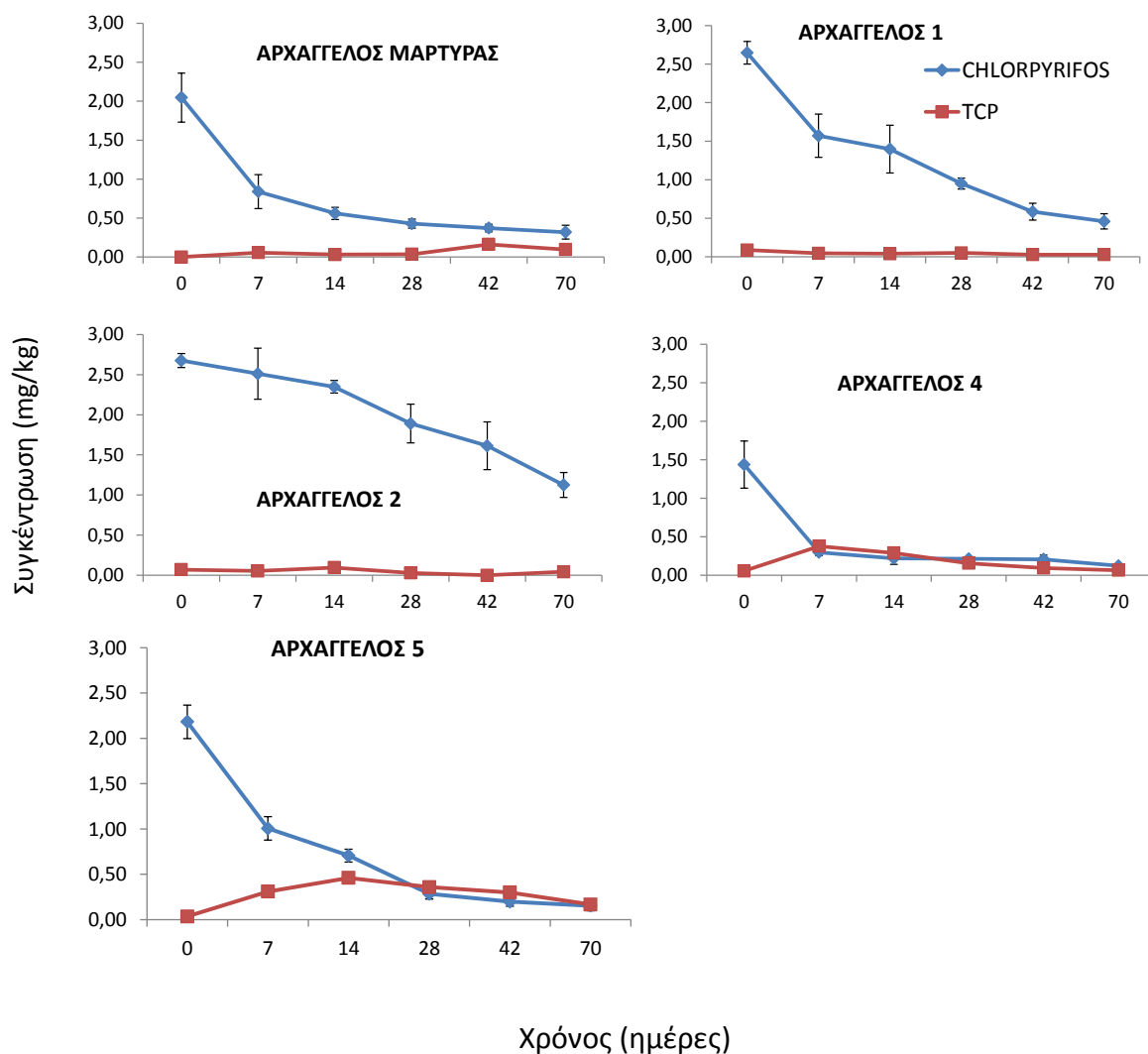


Διάγραμμα 3.1.3α Η αποδόμηση του chlorpyrifos και ο σχηματισμός του TCP στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας.



Διάγραμμα 3.1.3β Η αποδόμηση του chlorpyrifos και ο σχηματισμός του TCP στα εδάφη από το οροπέδιο του Νευροκοπίου.

Στα εδάφη από τις περιοχές Θήβας (Διάγραμμα 3.1.3α) και Νευροκοπίου (Διάγραμμα 3.1.3β) παρατηρήθηκε σχηματισμός χαμηλών ποσοτήτων TCP. Στα εδάφη Θήβα Μάρτυρας, Νευροκόπι Μάρτυρας και Νευροκόπι 3 παρατηρήθηκε σχηματισμός σημαντικών συγκεντρώσεων TCP ταυτόχρονα με τη φάση ταχείας αποδόμησης του chlorpyrifos. Αντίθετα, στα υπόλοιπα εδάφη από τις δύο αυτές περιοχές παρατηρήθηκε γενικά ένα πρότυπο όπου η αποδόμηση του chlorpyrifos δεν συνοδεύτηκε από αυξημένη παραγωγή και συσσώρευση TCP.

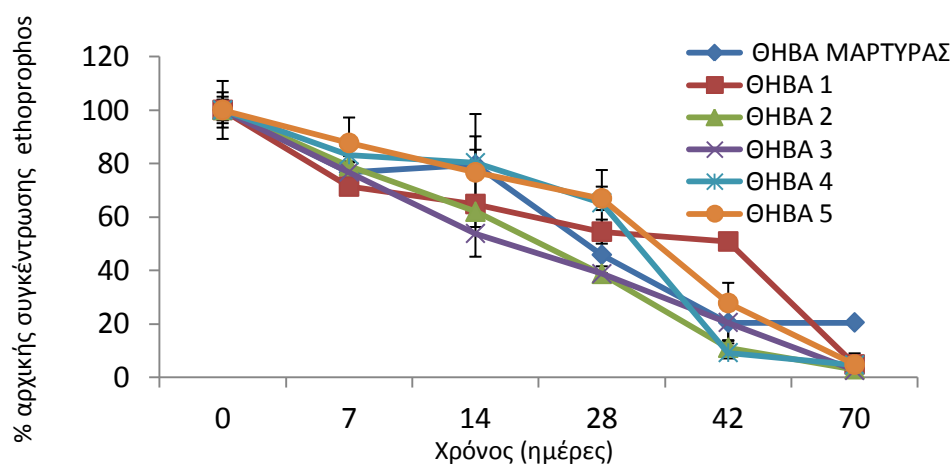


Διάγραμμα 3.1.3γ Η αποδόμηση του chlorpyrifos και ο σχηματισμός του TCP στα εδάφη από την περιοχή του Αρχαγγέλου.

Στα εδάφη του Αρχαγγέλου ο σχηματισμός του TCP στα εδάφη Αρχάγγελος 4 και 5 συνέπεσε με την φάση ταχείας αποδόμησης της μητρικής ουσίας (Διάγραμμα 3.1.3γ). Αντίθετα στα υπόλοιπα εδάφη από την περιοχή του Αρχαγγέλου η αποδόμηση του chlorpyrifos, ταχεία (Αρχάγγελος Μάρτυρας) ή βραδεία (Αρχάγγελος 1 και 2) δεν συνοδεύτηκε από παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων TCP.

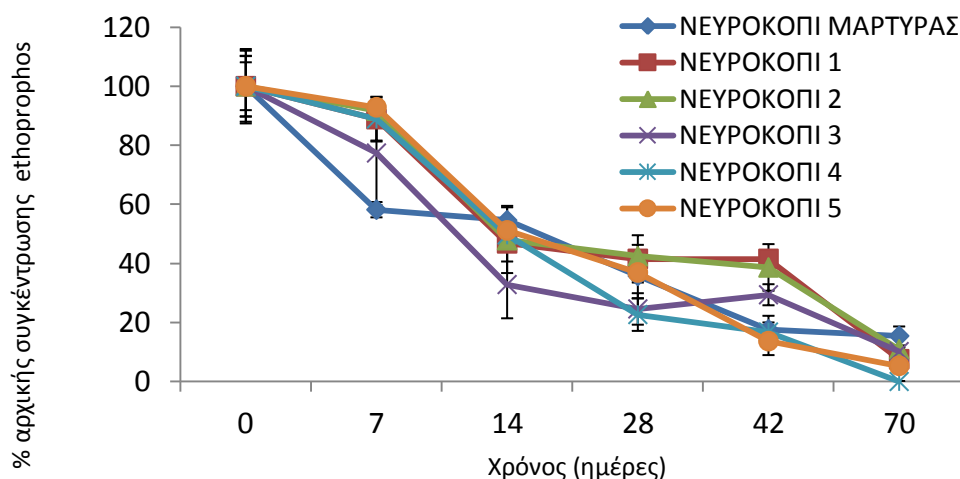
3.2 Αποδόμηση του ethorprophos

Η αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη από τις περιοχές Θήβας, Νευροκοπίου και Αρχαγγέλου παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στα Διαγράμματα 3.2.1, 3.2.2 και 3.2.3 αντίστοιχα.



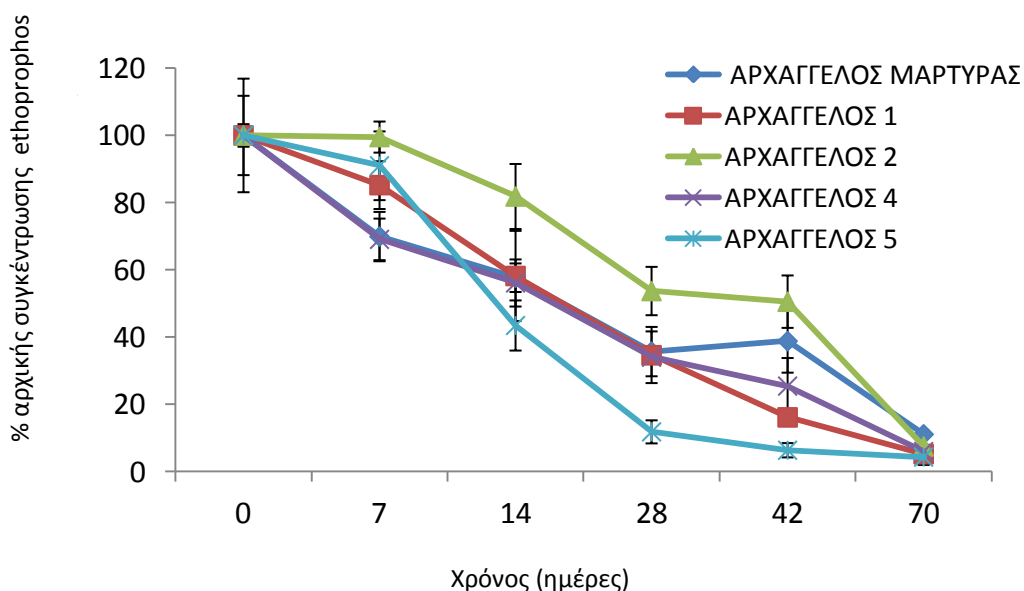
Διάγραμμα 3.2.1. Η αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Γενικότερα δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές στην αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας ανεξάρτητα από την ύπαρξη ιστορικού χρήσης και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών της περιοχής που δεν διέφεραν σε σημαντικό βαθμό μεταξύ τους.



Διάγραμμα 3.2.2. Η αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη από το οροπέδιο του Νευροκοπίου. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στα εδάφη από το οροπέδιο του Νευροκοπίου όπου η αποδόμηση του ethorprophos σε όλα τα εδάφη ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο ανεξάρτητα από το ιστορικό χρήσης του ethorprophos στα συγκεκριμένα εδάφη.



Διάγραμμα 3.2.3. Η αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη από τον Αρχάγγελο. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Στα εδάφη του Αρχαγγέλου παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση του ethorprophos στο έδαφος Αρχάγγελος 5 και βραδύτερη στο έδαφος Αρχάγγελος 2 χωρίς όμως αυτή η διαφορά να σχετίζεται με το ιστορικό χρήσης των συγκεκριμένων εδαφών καθώς κανένα από τα δύο εδάφη δεν παρουσιάζε ιστορικό χρήσης ethorprophos. Το μοναδικό έδαφος στο οποίο υπήρχε ιστορικό χρήσης ethorprophos (το έτος 2010) δεν εμφάνισε διαφορές στην ικανότητα αποδόμησης του ethorprophos σε σχέση με αντίστοιχα εδάφη από την ίδια περιοχή που δεν είχαν ιστορικό χρήσης του συγκεκριμένου νηματωδοκτόνου.

3.2.1 Προσδιορισμός των παραμέτρων κινητικής για την αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη που μελετήθηκαν

Η αποδόμηση του ethorprophos στα περισσότερα από τα εδάφη που αξιολογήθηκαν περιγράφηκε ικανοποιητικά από κινητική πρώτης τάξης και με βάση το συγκεκριμένο μοντέλο υπολογίστηκαν οι τιμές DT50 που παρουσιάζονται στους Πίνακες 15, 16 και 17. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν τα εδάφη Θήβα 4, Νευροκόπι 3 και Αρχάγγελος 5 όπου το συγκεκριμένο μοντέλο κινητικής δεν περιέγραψε ικανοποιητικά το πρότυπο αποδόμησης του ethorprophos (τιμές χ^2 οριακά υψηλότερες από το 15% που θεωρείται ως κατώφλι ικανοποιητικής προσαρμογής μοντέλων κινητικής σύμφωνα με τις προτάσεις του FOCUS, 2006). Για τα εδάφη αυτά αξιολογήθηκε η προσαρμογή και άλλων μοντέλων κινητικής που προτείνονται από το FOCUS (2006) και επιλέχθηκε το διφασικό μοντέλο κινητικής Hockey-Stick ως πιο κατάλληλο.

Πίνακας 15. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη της Θήβας σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης^(α) και το διφασικό μοντέλο Hockey – Stick^(β)

Εδάφη	K (d ⁻¹)	K ₁ (d ⁻¹)	K ₂ (d ⁻¹)	C ₀	t _b	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ ² (%)
Θήβα 1 ^(α)	0.023			94.4		30.5	101.4	13.4
Θήβα 2 ^(α)	0.040			102.7		17.4	57.8	7.4
Θήβα 3 ^(α)	0.038			99.5		18.1	59.9	5.2
Θήβα 4 ^(β)		0.016	0.063	97.9	28.0	31.9	57.4	7.1
Θήβα 5 ^(α)	0.026			105.4		26.7	88.7	12.1
Θήβα μάρτυρας ^(α)	0,028			100,5		24.8	82.3	10.2

Πίνακας 16. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του ethoprophos στα εδάφη του Νευροκοπίου σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης^(α) και Hockey – Stick^(β)

Εδάφη	K (d ⁻¹)	K ₁ (d ⁻¹)	K ₂ (d ⁻¹)	C ₀	t _b	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ ² (%)
Νευροκόπι 1 ^(α)	0.030			98.5		23.1	76.59	14.8
Νευροκόπι 2 ^(α)	0.030			99.6		23.2	77.12	13.6
Νευροκόπι 3 ^(β)		0.065	0.017	103.7	17.3	10.7	35.4	16.7
Νευροκόπι 4 ^(α)	0.048			105.9		14.5	48.2	11.6
Νευροκόπι 5 ^(α)	0.041			105.8		16.8	55.75	11.7
Νευροκόπι μάρτυρας ^(α)	0,037			92,0		18.5	61.49	12.3

Πίνακας 17. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του ethorprophos στα εδάφη του Αρχαγγέλου σύμφωνα με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης^(α) και Hockey – Stick^(β).

Εδάφη	K (d ⁻¹)	K ₁ (d ⁻¹)	K ₂ (d ⁻¹)	C ₀	t _b	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ ² (%)
Αρχάγγελος 1 ^(α)	0.040			103.9		17.4	57.8	5.6
Αρχάγγελος 2 ^(α)	0.023			108.3		29.9	99.3	10.3
Αρχάγγελος 4 ^(α)	0.037			96.2		18.7	62.2	5.6
Αρχάγγελος 5 ^(β)		0.059	0.015	108.6	49.9	11.7	39.0	12.6
Αρχάγγελος μάρτυρας ^(α)	0,029			93,4		23.5	78.1	10.1

Το ethorprophos παρουσίασε χαμηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT₅₀ που κυμάνθηκαν από 10.7 ως 31 ημέρες με μέση τιμή DT₅₀ για όλα τα εδάφη =21±6.4 ημέρες (Πίνακες 15, 16 και 17). Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε στα εδάφη που είχαν ιστορικό χρήσης ethorprophos σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του ethorprophos σε σχέση με τα αντίστοιχα εδάφη-μάρτυρες χωρίς ιστορικό χρήσης. Μοναδική ίσως εξαίρεση αποτελούν τα εδάφη Νευροκόπι 3 και 4 που εμφάνιζαν εκτεταμένο ιστορικό χρήσης ethorprophos όπου και παρατηρήθηκαν τιμές DT₅₀ 10.7 και 14.5 ημέρες αντίστοιχα σε σχέση με το αντίστοιχο έδαφος μάρτυρα με DT₅₀ = 19 ημέρες χωρίς ωστόσο οι διαφορές αυτές να συντείνουν στην ύπαρξη προβλήματος επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης.

3.2.2 Συσχέτιση DT₅₀ του ethoprophos με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν

Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων από όλα τα εδάφη δεν ανέδειξε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του DT₅₀ του ethoprophos και των διαφόρων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. Συσχετίσεις (Pearsons Correlation Test) μεταξύ DT₅₀ του ethoprophos και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που μελετήθηκαν

		pH	Οργανικός C	Άργιλος	Ίλος	Άμμος
DT50	Συντελεστής Συσχέτισης (r)	0,100	-0,219	0,356	-0,027	-0,272
	Πιθανότητες (p)	0,704	0,398	0,161	0,917	0,291

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η αποδόμηση του chlorpyrifos και του ethoprophos, που χρησιμοποιούνται στις περιοχές καλλιέργειας πατάτας στην Ελλάδα και διερευνήθηκε η επίδραση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην αποδόμηση τους.

4.1.1 Chlorpyrifos

Όσον αφορά το chlorpyrifos, η χαμηλότερη τιμή DT₅₀ παρατηρήθηκε στο έδαφος Θήβας 1 (2.7 ημέρες) και η υψηλότερη στο έδαφος Αρχάγγελος 2 (56 ημέρες). Στα εδάφη από την περιοχή της Θήβας παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση του chlorpyrifos ενώ ακολούθησαν τα εδάφη από το Νευροκόπι και τον Αρχάγγελο. Οι τιμές DT₅₀ που παρατηρήθηκαν στα εδάφη της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνες με προηγούμενες μελέτες από την διεθνή βιβλιογραφία. Έτσι ο Racke (1993) έδειξε ότι το chlorpyrifos παρουσιάζει μέτρια υπολειμματικότητα στο έδαφος με τιμές DT₅₀ που κυμαίνονται από 1 ως 6 εβδομάδες.

Η αποδόμηση του chlorpyrifos σε όλα τα εδάφη συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό του TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), το οποίο στα περισσότερα εδάφη αποδομήθηκε περαιτέρω. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης προκύπτει ως κύριο προϊόν μεταβολισμού του chlorpyrifos στο έδαφος.

Τα αποτελέσματα μας δεν δείχνουν ενδείξεις για ανάπτυξη επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης για το συγκεκριμένο εντομοκτόνο στις περιοχές καλλιέργειας πατάτας που μελετήθηκαν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το έδαφος Αρχάγγελος 2, που είχε ιστορικό χρήσης του chlorpyrifos και παρατηρήθηκε

η υψηλότερη τιμή $DT_{50} = 56$ ημέρες σε σύγκριση με το αντίστοιχο έδαφος-μάρτυρα με $DT_{50} = 5.5$ ημέρες. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που καταδεικνύουν την σχετική ανθεκτικότητα του chlorpyrifos στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής διάσπασης και η οποία είχε αποδοθεί στην παραγωγή του προϊόντος υδρόλυσης του chlorpyrifos, TCP που εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση (Racke et al. 1990).

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποδόμησης (DT_{50}) και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδάφων έδειξαν μια ξεκάθαρη σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ pH και DT_{50} . Όσο υψηλότερο το pH τόσο μικρότερο ήταν το DT_{50} . Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης καταδείξει τον καθοριστικό ρόλο του pH στην αποδόμηση του chlorpyrifos με σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης σε εδάφη με υψηλό pH (Racke et al. 1996).

4.1.2. Ethoprophos

Όσον αφορά το ethoprophos παρουσίασε και αυτό χαμηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT_{50} που κυμάνθηκαν από 10.7 ως 31 ημέρες και μέση τιμή DT_{50} για όλα τα εδάφη $=21 \pm 6.4$ ημέρες. Οι τιμές αυτές είναι σύμφωνες με τιμές DT_{50} που έχουν αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες όπως 11 ημέρες από τους Robinson et al. (1999) και 3-30 ημέρες από τους Jones & Norris (1998). Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε στα εδάφη που είχαν ιστορικό χρήσης ethoprophos σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του ethoprophos σε σχέση με τα αντίστοιχα εδάφη-μάρτυρες χωρίς ιστορικό χρήσης.

Παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση της μικροβιακής αποδόμησης στα συγκεκριμένα εδάφη που εμφάνιζαν ιστορικό χρήσης ethoprophos αλλά και περιορισμένη αποτελεσματικότητα. Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της Άνω Βροντού Σερρών (Karpouzas et al. 1999b, Karpouzas and Walker 2000) αλλά και σε άλλες περιοχές στην Ευρώπη (Smelt et al. 1996) και τις ΗΠΑ (Mohthedi et al. 1991) είχαν καταδείξει

την ευαισθησία του *ethoprophos* στο φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Τέλος, σε αντίθεση με το *chlorpyrifos* η αποδόμηση του *ethoprophos* δεν επηρεάζεται σημαντικά από συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών όπως είναι το pH και η συγκέντρωση του οργανικού άνθρακα.

4.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Από την παρούσα μελέτη προέκυψαν συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η αποδόμηση του **chlorpyrifos** στα διάφορα εδάφη δεν φαίνεται να συσχετίζεται με το ιστορικό χρήσης των εδαφών που μελετήθηκαν ενώ αντίθετα το εδαφικό pH φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αποδόμηση του συγκεκριμένου γεωργικού φαρμάκου με ταχύτατη αποδόμηση του να παρατηρείται σε εδάφη με ουδέτερο προς αλκαλικό pH.
- Η αποδόμηση του **ethoprophos** δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών (πχ. pH).
- Σε αντίθεση με προηγούμενες αναφορές στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν εδάφη με επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του **ethoprophos**.
- Περιορισμό εφαρμογής του **chlorpyrifos** σε εδάφη με αλκαλικό pH όπου διασπάται ταχύτατα ώστε να περιοριστεί ο κίνδυνος μειωμένης βιολογικής αποτελεσματικότητας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Accineli C., Dinelli G., Vicari A., Catizone P.**, (2001). Atrazine and metabolachlor degradation in subsoil. *Biology and Fertility of Soils* 33: 495-500.
- **Ahmad, R., Nelson, P.N., Kookana, R.S.**, 2006. The molecular composition of soil organic matter as determined by ¹³C NMR and elemental analyses and correlation with pesticide sorption. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 883–893.
- **Aislabie J., and Lloyd-Jones G.**, (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research.* 33, 925-942.
- **Alexander M.** (1999), "Biodegradation and Bioremediation", Second Edition, Ithaca, New York: Academic Press, ISBN 0-12-049861-8.
- **Anderson J.P.E., Nevermann K. and Haidt H.**, (1998.) Accelerated microbial degradation of nematicides in soils: Problem and its management. In: *Proceedings of the XII Acorbat Meeting.* Guayaquil, Ecuador, pp 568-57.
- **Arbeli Z., Fuentes C.L.** (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26: 1733-1746.
- **Arias-Este'vez, M., Soto-González, B., López-Periago, E., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J.**, 2005a. Atrazine sorption dynamics in organic matter rich-soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 264–271.
- **Arias-Este'vez, M., Torrente, A.C., López-Periago, E., Soto-González, B., Simal-Gándara, J.**, 2005b. Adsorption–desorption dynamics of cyprodinil and fludioxonil in vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.* 53 (14), 5675–5681.
- **Bollag J.M. and Liu S.Y.**, (1990). Biological transformation processes of pesticides, in *Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling.* Soil Science Society of America. 169-261.
- **Brajesh K. Singh and Allan Walker** (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds.
- **Chapman, R.A., Harris, C.R.** (1990) Enhanced degradation of insecticides in soils. In: *Racke, K.D., Coats, J.R., (Eds) Enhanced biodegradation of pesticides in the environment,* American Chemical Society, Washington, DC, pp 82-96.
- **Cook AM, Alexander M & Daughton CG** (1980) Desulfuration of dialkyl thiophosphoric acids by a pseudomonad. *Appl Environ Microbiol* 39: 463–465.
- **Cook AM, Daughton CG & Alexander M** (1978a) Phosphonate utilization by bacteria. *J Bacteriol* 133: 85–90.
- **Coquet, Y.**, 2003. Sorption of pesticide atrazine, isoproturon, and metamitron in the Vadose Zone. *Vadose Zone J.* 2, 40–51.
- **Cupta R.C.** (2005) *Toxicology of organophosphate and Carbamate pesticides.* Academic press, Inc, NY, USA.

- **Daughton CG & Hsieh DP** (1977) Parathion utilization by Bacterial symbionts in a chemostat. *Appl Environ Microbiol* 34: 175–184.
- **De Jonge, R.J., Breure, A.M., van Anel, JG**, 1996. Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC). *Water Res.* 30 (4), 883–892.
- **Di H.J., Aylmore L.A.G. and Kookana R.S.** (1998). Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science* 163: 404-411.
- **Dimitrios G Karpouzas , Allan Walker, Robert J Froud-Williams and Donald SH Drennan.**(1999) Evidence for the enhanced biodegradation of ethoprophos and carbofuran in soils from Greece and the UK. *Pestic Sci* 55:301.311.
- **Dimitrios G. Karpouzas , J. Alun W. Morgan , Allan Walker.**(2000) Isolation and characterisation of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 33 (2000) 209^218.
- **Felsot A.S.** (1989). Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agroecosystems. *Annual Review of Entomology* 34: 453-476.
- **Felsot A.S., Shelton D.R.** (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical process and microbial ecology. *SSSA Special Publication* 32: 227-251.
- **Felsot, A.S.** (1989) Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agrosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 454^476.
- **Feng Y, Racke KD & Bollag JM** (1997) Isolation and characterization of a chlorinated pyridinol degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol* 63: 4096–4098.
- **FOCUS** (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, 434 pp.
- **Getzin, L.W.** (1981a). Degradation of chlorpyrifos in Soil: Influence of autoclaving, soil Moisture and Temperature. *J Econ ENTOMOL*, 74, 158-162.
- **Guo, L., Jury, W.A., Wagenet, R.J., Flury, M.**, 2000. Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. *J. Contam. Hydrol.* 43 (1), 45–62.
- **Horne, I, Sutherland T.D., Harcourt, R.L. Russel R.J. and Oakeshott J.G.** (2002). Identification of an opd (organophosphate degradation) Gene in *Agrobacterium* Isolate *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3371-3376.
- **Jones A.S. Hastings, F.L.** (1981) Soil microbe. In : Hastings F.L., Coster J.E., (eds). Field and laboratory evaluations of insecticides for southern pine beetle control. USDA. Southern Forest Experimental Station , Forest Service, SE 21 ,pp 13-14, 35.
- **Jones RJ and Norris FR**, (1998) Factors affecting degradation of aldicarb and ethoprop. *J Nematol* 30:45-55.

- **Jones, R.J. and Norris, F.R.** (1998) Factors affecting degradation of aldicarb and ethoprop. *J. Nematol.* 30, 45-55.
- **Karpouzas D.G. and Walker A.,** (2000b). Aspects of the enhanced biodegradation and metabolism of ethoprophos in soil. *Pest Management Science* 540-548.
- **Karpouzas, D.G., and Walker, A.** (2000c). Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1753-1762.
- **Karpouzas, D.G., Walker, A., Froud-Williams, R.J., and Drennan D.S.H.** (1999a) Evidence for the enhanced biodegradation of ethoprophos and carbofuran in soils from Greece and the UK. *Pesticide Science* 55: 301-311
- **Karpouzas, D.G., Giannakou, I.O., Walker, A., and Gowen, S.R.** (1999b). Reduction in biological efficacy of ethoprophos in a soil from Greece due to enhanced biodegradation: comparing bioassay with laboratory incubation data. *Pesticide Science* 55: 1089-1094
- **Kertesz MA, Cook AM & Leisinger T** (1994a) Microbial metabolism of sulfur and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiol Rev* 15: 195-215.
- **Kookana R. S., Baskaran S., and Naidu R.,** (1998). Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review, *Australian Journal of Soil Research.* 36, 715-764.
- **Kuo, J.** (1999). *Practical Design Calculations for Groundwater and Soil remediation.* Lewis Publishers, USA.
- **Levanon D.,** (1993). Roles of Fungi and Bacteria in the mineralization of pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology & Biochemistry.* 25, 1097-1105.
- **Linn, D.M., Carski, T.H., Brusseau, M.L., Chang, F.H. (Eds.),** 1993. *Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil.* Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 260.
- **Lo'pez-Blanco, C., Cancho-Grande, B., Simal-Ga'ndara, J., Lo'pez-Periago, E., Arias-Este'vez, M.,** 2005. Transport of commercial endosulfan through a column of aggregated vineyard soil by a water flux simulating field conditions. *J. Agric. Food Chem.* 53 (17), 6738-6743.
- **Lo'pez-Pe'rez, G.C., Arias-Este'vez, M., Lo'pez-Periago, E., Soto-Gonzalez, B., Cancho-Grande, B., Simal-Ga'ndara, J.,** 2006. Dynamics of pesticides in potato crops. *J. Agric. Food Chem.* 54 (5), 1797-1803.
- **Malato S., Caceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernandez-Alba A.R.,** (2001). Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: A comparative study, *Environmental Science and Technology*, 35, 4359-4366.

- **Mallick, K., Bharati, K., Banerji, A., Shakil, N.A., and Sethunathan, N.** (1999). Bacterial Degradation of chlorpyrifos in Pure cultures and in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62,48-54.
- **Manahan SE** (1992) *Toxicological Chemistry*. 2nd edn. Lewis, London.
- **Munnecke, D.M. and Hsien, D.P.H.** (1975). Development of Microbial Systems for the Disposal of Concentrated Pesticide Suspensions. *Med Facul Landbouww Rijksuniv Gent* 40, 1234-1247.
- **Racke K., Coats J.R.** (1988). Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: Specificity of enhanced microbial degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 193-199.
- **Racke KD** (1993) Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol* 131: 1–154.
- **Racke KD, Laskowski DA & Schultz MR** (1990) Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *J Agric Food Chem* 38: 1430–1436.
- **Racke, K.D.** (1993) Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 131, 1-154.
- **Racke, K.D. Steele KP., Yoder RB., Dick WA., Avidov E** (1996) Factors Affecting the Hydrolytic Degradation of Chlorpyrifos in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1582-1592.
- **Racke, K.D., Coats J.R. and Titus, K.R.** (1988). Degradation of chlorpyrifos and its Hydrolysis Products 3,5,6-trichoro-2-pyridinol, in soil. *Journal of environmental Contamination and Toxicology* , 131, 1-151.
- **Racke, K.D., Laskowski, D.A., Schultz, M.R.** (1990) Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1430–1436.
- **Ragnarsdottir KV** (2000) Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J Geological Soc* 157: 859–876.
- **Rao PSC and Hornsby AG**, 2001. Behavior of pesticides in Soil and Water. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A
- **Rao, P.S.C., Mansell, R.S., Baldwin, L.B., Laurent, M.F.,** 1983. Pesticides and their Behavior in Soil and Water. Soil Science Fact Sheer. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- **Read D.C.** (1986b). Greatly accelerated microbial degradation of Aldicarb in re-treated field soil, in flooded soil and in water. *Journal of Economic Entomology* 80: 156-163.
- **Rial-Otero, R., Gonza'lez-Rodri'guez, R., Cancho-Grande, B., Simal-Ga'ndara, J.,** 2004. Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.* 52 (24), 7227–7234
- **Richins R, Kaneva I, Mulchandani A & Chen W** (1997) Biodegradation of organophosphorus pesticides using surfaceexpressed organophosphorus hydrolase. *Nature Biotechnol* 15: 984–987.
- **Robinson DE, Mansingh A., Dasgupta TP.** (1999) Fate and transport of ethoprophos in the Jamaican environment. *Science of the Total Environment* 237 238: 373-378.

- **Simon L, Spiteller M, Wallnofer P.R.** (1992). Metabolism of fenamiphos in 16 soils originating from different geographic areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 312-317.
- **Singh BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R & Triapthi KK** (1999) Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Crit Rev Biotechnol* 19: 197–225.
- **Smelt JH, Van de Peppel - Groen AE, Van de Pas LJ and Dijksterhuis A,** (1996) Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils. *Soil Biol Biochem* 28:1757-1765.
- **Sogorb MA & Vilanova E** (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett* 128: 215–228.
- **Somasundaram, L., Coats J. R., Racke, K.D. and Stahr, H.M.** (1987). Application of the Microtox System to Assess the Toxicity of Pesticides and Oxydursban Metabolites. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44,p. 254-259.
- **Spark, K.M., Swift, R.S.,** 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Sci. Total Environ.* 298 (1–3), 147–161.
- **Suett D.L., Fournier J-C., Papadopoulou Mourkidou E., Pussemier L., Smelt J.** (1996). Accelerated degradation : the European dimension. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1741-1748.
- **Thiegs, B.J.** (1966). Degradation of [14C] Dursban in Soil. DowElanco, Indianapolis, IN (Unpublished report)
- **Toole G & Toole S** (1995) *Understanding Biology*. 3rd edn. Stanley Thornes, Cheltenham, UK..
- **Topp E., Vallaeyts T., Soulas G.,** (1995). Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. *Modern soil Microbiology*, pp. 547-575.
- **Topp, E., Vallaeyts, T., Soulas, G.,** 1997. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 547–575.
- **Walker A. and Roberts S.J.** (1993). Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. In: *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy, pp: 357-370.
- **Wang AA, Mulchandani A & Chen W** (2002b) Specific adhesion to cellulose and hydrolysis of organophosphate nerve agents by a genetically engineered *Escherichia coli* strain with a surface-expressed cellulose-binding domain and organophosphorus hydrolase. *Appl Environ Microbiol* 68: 1684–1689.
- **Bidlack H.D.** (1979) Degradation of chlorpyrifos in soil under aerobic, aerobic/anaerobic and anaerobic conditions. DowElanco, Indianapolis, IN (unpublished report).
- **Άρτεμις Παλαιογιάννη Μπέλου** Πολυτεχνείο Κρήτης 2008
- **Β. Ζιώγας και Γ.Α. Μάρκογλου,** Φαρμακολογία, ΑΘΗΝΑ, 2007.

- **Δ.Θ. Λύκας**, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2009).
- **Εμμανουήλ Δ. Τσοχατζής** Θεσσαλονίκη 2012
- **Η.Γ. Ελευθεροχωρινός**, (2008), Ζιζανιολογία, Εκδόσεις Αγρότυπος Α.Ε, Μαρούσι, Αθήνα.
- **Ο. Μενκίσογλου-Σπυρούδη**, Σημειώσεις μαθήματος ΜΔΕ, Γεωπονική Σχολή.